

INSTITUTUL DE MEDICINA SI FARMACIE - IASI -
DISCIPLINA DE BIOLOGIE CELULARA

ASSEM 11/1804

~~Khaled Ali~~

GRID

de

LUCRARI PRACTICE

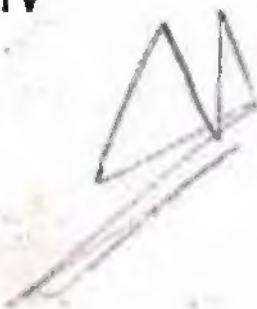
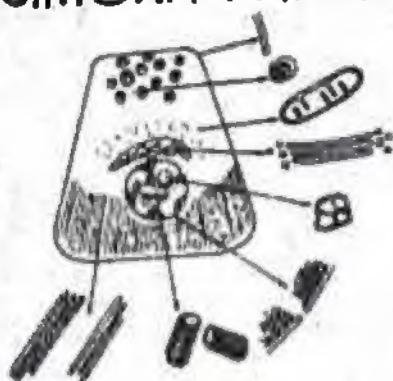
Dr. C. COTRUTZ

in colaborare cu:

Biol. MARIA ADOMNICAI

Biol. SILVIA PORUMB

Dr. SIMONA PARASCHIV



IASI - 1981

In collaborazione con

Biol. Adomnică Maria

Biol. Portum Silvia

Dr. Paraschiv Simion: Moleculärä care

Mille d'intre

Vice si biofizica

resonantă

?tia neutroni-

LITOGRAFIA I.M.P. Lecce - 1981

त्रिवेदी

Biblioteca F.M.F.

INSTITUTUL DE MEDICINA SI PARACIENCIAS
DISCIPLINA DE BIOLOGIE CELULARA

G H I D
DE
LUCRARII PRACTICE

DR. C. COTRUTZ



Scanned with OKEN Scanner

1. METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC IN MICROSCOPIA FOTONICA

1.1. Introducere

Informațiile structurale, fiziologice, biochimice, biofizice, matematice, etc. în biologie s-au dovedit a avea o valoare deosebită pentru înțelegerea modului de organizare și funcționare a materiei vii.

Prin intermediul difracției cu raze X s-a elucidat mecanismul replicării A.D.N.-ului, a transcrierii acestei macromolecule, a biosintizei proteinelor, moment în care a luat ființă biologia moleculară care demonstrează cu multă acuratețe relațiile dintre structură și funcție.

Cu ajutorul unor metode biochimice și biofizice cum ar fi rezonanța electronică de spin, rezonanța magnetică nucleară, fluorometria, difracția neutronilor, etc. s-au putut obține în ultimii ani date valoroase despre organizarea structurilor subcelulare.

În limită mari, în biologia celulară sunt următoarele metode de studiu :

- A - morfologice
- B - biochimice
- C - fiziologice
- D - biofizice

A. - Metodele morfologice utilizează ca aparat
microscopul optic (fotonic sau luminos) și electronic
(a se vedea cursul de Biofizică).

1. - Examenul citologic în microscopia fotonică
este limitat de puterea de separare sau rezoluție a aparatului (puterea de rezoluție a microscopului photonic reprezintă ceea mai mică distanță la care două puncte pot fi văzute distinct).

Puterea de rezoluție se calculează după formula lui Abbé. (Biofizică).

Se consideră că limita maximă a puterii de rezoluție a microscopului optic este de 0,2 microni, limită care se crede că nu va putea fi depășită.

Prin montarea unor dispozitive speciale, la microscopul optic se poate realiza :

1. + microscopia în contrast de fază permite studiul celulelor în stare vie (celule nefixate și necolorate), scoțind în evidență unele detalii de structură care nu se pot observa la microscopul optic obișnuit; ea este folosită la studiul celulelor în culturi, a mișcărilor

celulare (cu sau fără deplasare), a reacțiilor celulare la diferenți agenti (fizici sau chimici), etc;

2. + microscopia de fluorescentă utilizează radiațiile ultraviolete emise de o lampă cu vaporii de mercur; aceste radiații ultraviolete care sunt invizibile, după traversarea unui preparat microscopic devin vizibile. Fluorescența poate fi naturală, produsă de substanțe care se găsesc în mod normal în celulă (auto-fluorescență) și secundară, provocată prin tratarea preparatelor cu anumite substanțe numite fluorocromi (tioflavina, acridin-orange, etc.).

Microscopia de fluorescentă se utilizează în special în identificarea antigenelor în celule (imuno-fluorescență), în studiul benzilor fluorescente ale cromozomilor, în identificarea unor substanțe din celule, etc.;

3. + microscopia pe fond întunecat sau ultramicroscopia permite examinarea celulelor și bacteriilor în suspensie; nu se pot observa structuri ci numai particole din citoplasma celulelor vii (este un fenomen similar observării particulelor de praf într-o rază de soare).

2. - Citologia în microscopia electronică permite studiul alcătuirii moleculare a structurilor biologice (puterea de rezoluție $1,2 \text{ \AA}$).

Există mai multe tipuri de microscopie electronice dintre care două sunt mai utilizate în biologie :

1. - Microscopul electronic de transmisie (T.E.M. - Transmission Electron Microscope) cu ajutorul căruia imaginea ultrastructurală a celulei este proiectată pe un ecran fluorescent;
2. - Microscopul electronic de baloaj (S.E.M. - Scanning Electron Microscope), utilizat în studiul ultramorfologiei suprafetelor celulare cu ajutorul electronilor secundari sau reflectați.

B. - Metodele citochimice și citoenzimologice se utilizează pentru evidențierea localizării precise a constituenților chimici și enzimatici din celule.

C. - Metodele fiziologice stabilesc experimental rolul funcțional al structurilor celulare.

D. - Metodele biofizice explică fenomenele fizice care se petrec la nivel celular (de exemplu legile fizice după care se realizează transportul prin membrană).

Unitățile de măsură folosite în studiul celulelor sunt :

- 1 micron sau 1 micrometru = 10^{-3} mm
- 1 milimicron sau 1 nanometru = 10^{-6} mm
- 1 Angström = 1/ 10 milimicroni.

Pentru obținerea unor preparate bune se impune folosirea unor timpi operatori de prelucrare a pieselor a căror cronologie trebuie respectată cu rigurozitate.

În ordinea lor acești timpi sunt :

1.2. Recoltarea pieselor

Recoltarea reprezintă unul din timpii cei mai dificili în tehnica citologică deoarece, cu maximum de operativitate, după sacrificarea animalului de experiență sau obținerea unui preparat prin biopsie sau alt act operator, trebuie să se obțină un fragment de țesut sau organ care să conțină populația celulară ce trebuie studiată.

Recoltarea se face pe o placă de plută sau de P.V.C. foarte curată ; se folosesc pense fine fără dinți care se manipulează cu delicatețe pentru a nu strivi preparatul ; în același scop, la fasonarea pieselor se folosesc lame de ras noi, degresate).



În cazul în care țesutul are o consistență moale (sistem nervos central, testicul) și recoltarea fragmentelor nu se poate face fără riscul strivirii lor, se preferă fixarea unor fragmente mai mari timp de 1-2 ore, perioadă în care structurile superficiale se întăresc și permit fasonarea fragmentelor dorite (pentru citologie, această operație se face la o temperatură de + 4°C).



Pieselete recoltate trebuie să aibă fețele plane și paralele, cu o grosime de 1-4 mm (grosimea

mică usurează pătrunderea mai rapidă a fixatorului în piesa de studiat).

1.3. Fixarea și fixatori citologici

Prin fixare se înțelege manopera care are drept scop oprirea alterării structurilor celulare după scoaterea din organismul viu a unui fragment de țesut; fixarea păstrează formă, structură și compozită chimică a celulelor vii.

Tipuri de fixan

Agentii fixatori se combină cu numeroase grupe funcționale ale moleculelor proteice care reprezintă partea principală a constituenților celulași, formând macromolecule insolubile în lichidele utilizate de tehniciile de includere.

Prin coagularea proteinelor de către agentii fixatori se blochează reacțiile enzimaticе, împiedicindu-se în acest fel distrugerea autolitică a celulelor.

Condiții
Un bun fixator citologic trebuie să îndeplinească următoarele condiții :

- a) să pătrundă rapid în țesut ;
- b) să producă o retracție cât mai mică a pieselor evitând modificarea taliei, formei și raporturilor dintre celule ;
- c) să permită o bună includere la parafină

Fixarea se realizează prin :

I. agensi fizici ||- desicare
 ||- criodesicare

II. agensi chimici ||- fixatori simpli
 ||- amestecuri fixatoare

I. Agensi fizici

a) desicarea sau uscarea este folosită în special în tehnica hematologică. (vezi capitolul 3).

b) criodesicarea sau uscarea sub vid ("freeze drying" ai autorilor anglo-saxoni) este o metodă care permite obținerea cu un minimum de alterări celulare a unor secțiuni fine în care structurile sunt păstrate fără modificări chimice importante.

Timpii criodesicării sunt :

1 + congelarea bruscă în azot lichid a unui fragment de țesut proaspăt ;

2 + desicarea lui sub vid și la o temperatură suficient de coborită pentru ca apa tisulară să treacă direct din starea solidă în starea de vapor (liofilizare) ; prin această manoperă se evită difuzarea substanțelor din țesuturi.

3 + impregnarea directă cu parafină sub vid a țesutului uscat.

II. Agensi chimici

I. Fixatori simpli. În tehniciile de citologie se folosește fără adjuvanți o singură substanță:

tetraoxidul de osmu (OsO_4), impropriu denumit acid osmic. Conservă foarte bine structurile celulare dar are dezavantajul că pătrunde foarte încet în piesă (0,5 mm în 24 ore).

In soluție apoasă este folosit în conservarea mitocondriilor și a complexului Golgi, iar sub formă de vapori pentru fixarea țesuturilor.

Datorită fixării lente, a costului ridicat, a toxicității sale (conjunctivite), tetraoxidul de osmu are o utilizare redusă în microscopia fotonică.

2) Amestecuri fixatoare se împart în patru grupe :

a) Amestecurile cromo-omice conservă foarte bine structurile nucleare, centrozomii, aparatul fuscorial, diferențierile membranei celulare ca marginea în perie, platoul striat și cilii.

Timpul optim de fixare este de 12 - 24 ore.

Retracțiile sunt mici și piesele se pot include în parafină. Principalele amestecuri cromo-omice sunt următoarele : Flemming, Benda, Champy, Nassonov, Benoit, etc.

b) Amestecurile cromice fără OsO_4 și acid acetic, sunt folosite pentru studiul mitocondriilor și permit impregnarea argentică a complexului Golgi. Dintre acestea mai folosite sunt amestecurile fixatoare: Orth, Kopsch, Regaud, Helly, Maximov, etc.

Timp optim de fixare 6 - 24 ore.

c/ Amestecurile pe bază de metale grele în afara de crom și OsO₄, conservă mitocondriile și permit împregnarea argentică a complexului Golgi. Din aceste amestecuri se cunosc următorii trei fixatori: Ramon y Cajal, Da Fano și Aoyama.

Timp optim de fixare 3 - 25 ore.

d/ Amestecuri cromo-acetice se folosesc în studiul granulelor de secreție a ergastoplasmăi, a ciliilor și în cercetări de cariologie. Se cunosc fixatorii: Telliesniczky, Kolmer, Sanfelice, etc.

Alți fixatori

În cercetarea biologică, în afara celor patru grupe de amestecuri fixatoare descrise mai sus, se utilizează cu rezultate asemănătoare și alți fixatori. Aceștia sunt:

1. L. Formol - calciu BAKER, un bun fixator pentru mitocondrii și complexul Golgi.

2. Fixatorii CLARKE și CARNOY, conservă foarte bine ergastoplasma.

3. Fixatorii BOUIN, SUSA, HEIDENHEIM, sunt utilizati în studiul produsilor de secreție celulară.

Nici-un fixator citologic nu este universal și de aceea arta fixării constă în alegerea corectă a amestecului, în raport de ceea ce trebuie studiat.

(Tabel nr. 1).

Pentru o bună fixare este necesar să se țină seama de următoarele reguli:

a/ evitarea alterărilor autolitice printr-o

Tabel nr. 1.

ORGANITUL CELULAR SI FIXATORUL INDICAT

ORGANIT	FIXATORII UTILIZATI
Nucleul	Helly, Newcomber, Carnoy, Zenker, Maximov.
Nucleolul	Sanfelice și fixatori pe bază de trioxid de crom, formol.
Complex Golgi	Cajal, Da Fano, Aoyama, Champy, formol-calciu.
Mitocondria	Orth, Kopsch, Regaud, Kolster, formol-calciu.
Ergastoplasma	Tetraoxid de osmiiu, Bouin, Susa, Clarke, Carnoy.
Centrozomul	Fixatori cromo-osmici, Bouin, Susa, Clarke, Carnoy.
Marginea în perie	
Platou striat	Amastecuri cromo-osmice, Carnoy
Ciliu.	
Granule de secretie	Orth, Bouin, Helly.

1.1

fixare cît mai rapidă după moartea, punetia biopsia sau exereza unui organ;

b/ prelevarea corectă a pieselor;

c/ utilizarea unor flacoane cu fundul plat pe care se asează o hîrtie de filtru sau tifon ; flacoanele trebuie să fie suficient de încăpătoare și să permită introducerea unei cantități suficiente de fixator (aproximativ de 40-50 ori mai mare decât al fragmentului de fixat).

d/ agitarea pieselor din timp în timp, în primele ore ale fixării pentru a menține aceeași componenție chimică a fixatorului care vine în contact cu fragmentul de țesut;

e/ durata fixării variază de la cîteva ore la cîteva zile, în funcție de fixatorul utilizat, strucțura și dimensiunile pieselor.

1.4. Oprirea fixării

Se realizează prin eliminarea fixatorului în exces spălînd piesa fixată în apă curgătoare (12-24 ore) sau direct în alcool (în cazul folosirii fixatorilor pe bază de alcool - Carnoy).

1.5. Includerea în parafină

Pentru o includere corectă sunt necesari patru timpi:

1. deshidratarea pieselor din care s-a eliminat fixatorul în exces;
2. clarificarea și impregnarea lor cu un lichid miscibil cu parafina;
3. impregnarea cu parafină ;
4. turnarea blocului.

1. Deshidratarea este un timp necesar deoarece apa nu este miscibilă cu parafina.

Pentru deshidratare se folosesc : alcoolul etilic, acetona, dioxanul, etc.

Deshidratarea cu alcool etilic se realizează prin trecerea pieselor în băi cu alcooluri de concentrație crescîndă. Pentru cercetări de citologie se folosește cîte o baie de alcool de 50° , 70° , 80° , 96° și trei băi de alcool absolut.

Pentru piese cu o grosime de 5 mm, durata deshidratării este de cîteva ore (5-8 ore). Cînd piesele au fost fixate într-un lichid pe bază de alcool, deshidratarea începe cu alcoolul absolut (Carnoy).

2. Clarificarea care urmează deshidratării, are drept scop îndepărtarea din piesă și înlocuirea lui cu o substanță miscibilă cu parafina cu care urmează să fie impregnată piesa.

Pentru clarificare, piesele deshidratate sunt trecute prin trei băi successive de : xilen, benzen, toluol sau alcool amilic, durata optimă fiind de 5-8 ore pentru piese cu o grosime de 3-4 mm și de 30 minute - 1 oră pentru un fragment bioptic.

La sfîrșitul clarificării, piesa capătă un carecare grad de transparentă.

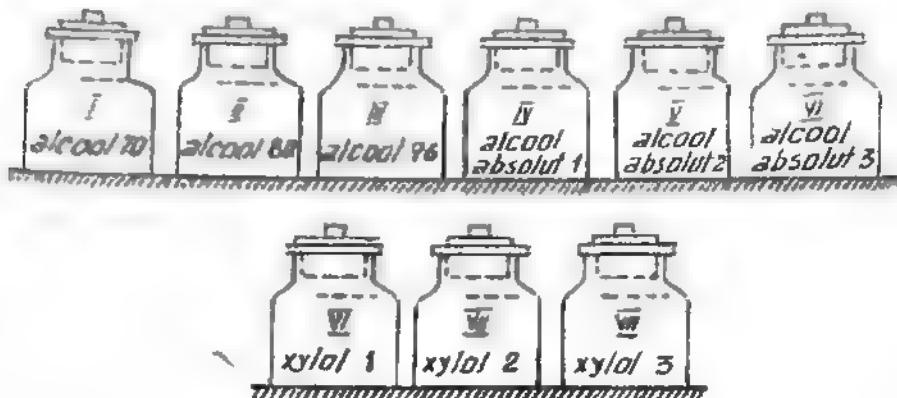


Fig. 1. - Baterie pentru includere la parafină

3. Impregnarea cu parafină se face într-un termostat la temperatura de 56°C , în care trecem piesele prin trei băi de parafină topită.

Parafina pentru impregnare conține 5 - 10 % ceară de albine care modifică consistența blocului, permitînd o bună secționare a țesutului inclus.

Durata optimă pentru o impregnare corectă este de 18-24 ore, adică 6-8 ore pentru fiecare baie.

În cazul utilizării includerii sub vid, durata impregnării este mult mai mică.

4. Turnarea blocului sau includerea prouiu-zisii

Se toarnă parafina topită într-o formă de metal sau hîrtie, puțin mai mare decât piesa; cu o pensă încălzită se scoate fragmentul de țesut din ultima baie și se introduce în parafina turnată anterior, avînd

grijă ca ea să fie orientată cu suprafața care va fi secționată spre fundul formei.

După răcirea și întărirea blocului, includerea se consideră încheiată și se poate trece la timpul ulterior.

1.6. Sectionarea blocurilor

Sectionarea blocurilor se face cu ajutorul unui aparat numit microtom de parafină cu care se pot realiza secțiuni de 3 - 5 microni.

Blocul de secționat se fixează pe un port obiect care se montează la microtom (Fig. 2).

În jurul piesei se lasă o bandă de parafină groasă de maximum 1 - 2 mm.

Blocul împreună cu port-obiectul microtomului suferă la fiecare învîrtire a roții microtomului o dublă mișcare : una de înaintare realizată cu ajutorul unui șurub micrometric cu care se reglează grosimea secțiunilor și o mișcare verticală prin care piesa întilnește cutitul fix al microtomului.

1.7. Lipirea secțiunilor pe lamă. În vederea prelucrării lor ulterioare (colorare) secțiunile sunt aplicate pe un port-obiect de sticlă sau lamă perfect uscată, cu dimensiunile de 76/26 mm și grosimea de 1 - 1,5 mm. Pentru a nu fi îndepărtate în timpul manevrelor ulterioare, secțiunile sunt lipite pe

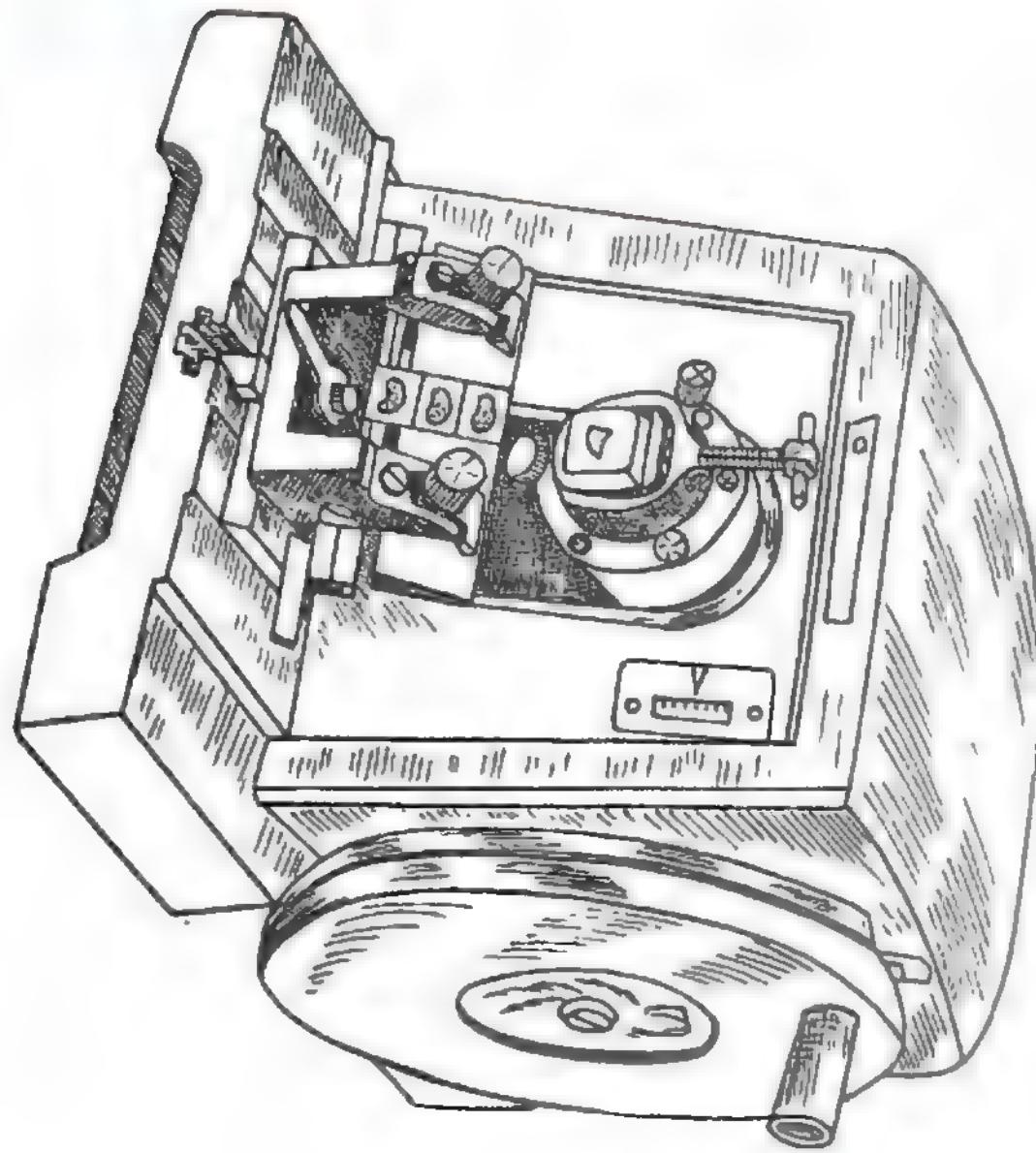


Fig. 2. Microtonul de parafină și poziția blocului de parafină față de muchia cutitului.

port-obiect prin intermediul unei pelicule fine de albumină Mayer (albus de ou și glicerină în părți egale) sau o soluție apoasă de gelatină 0,1 - 0,2 %.

Etalarea secțiunilor pe lamă se face pe o platină încălzitoare și durează cîteva secunde. Se îndepărtează apoi apa iar lamele puse oblic pe un stativ de lemn se introduc într-un termostat la 37°C , unde timp de 24 ore se desăvîrșește uscarea și lipirea secțiunilor.

În vederea colorării propriu-zise, secțiunile se deparafinează prin trecerea lor prin trei băi de xilol, benzen sau toluol ; solventii parafinei sînt îndepărtați trecînd lamele cu secțiuni prin trei băi de alcool de concentrații crescînd de unde sînt introduse apoi într-un pahar cu apă (hidratate).

2. COLORAREA SI COLORANTI IN CITOLOGIE

2.1. Introducere

- Colorarea constituentilor cellulari este un fenomen foarte complex în care intervin factori fizici și mecanisme chimice.
- Colorarea este o metodă necesară deoarece examinarea preparatelor proaspete, adică nefixate și necolorate nu oferă detalii structurale necesare studiului citologic.

2.2. Coloranți

Coloranții citologici sunt de obicei produși de natură organică, capabili să coloreze o substanță sau un grup de substanțe dintr-o celulă conferindu-le culori specifice.

Pentru îndeplinirea acestui deziderat, sunt necesare două proprietăți :

1) a/ colorantul să posede grupări atomice speciale care-i conferă colorarea, grupări care sunt numite "cromofore";

2) b/ să conțină grupări care-i permit o fixare permanentă pe substanța de colorat din celulă; aceasta se numește "grupare auxocromă".

Marea majoritate a coloranților utilizati în biologie sunt produși organici de sinteză. Compușii organici prevăzuți cu grupări cromofore se numesc "cromogene".

Principalele grupe cromofore responsabile de caracterul colorat al coloranților biologici uzuali sunt : grupa azo, azină, de tip indamină sau tiazină, gruparea nitro și nucleu aromatic sub formă chinonică.

2.3 Clasificarea coloranților

Coloranții utilizati în biologia celulară se pot clasifica în mai multe criterii.

1) După origine :

- + naturali, de origine naturală sau vegetală (ex.: safranina, indigoul, carminul, orceina, hematoxilina);
- + sintetici, (ex.: albastru de metil).

2) După comportamentul în soluție

- + coloranți acizi sau anionici care se atâșează de structurile subcelulare încărcate pozitiv; ei colo-

zează citoplasma celulară (coloranți citoplasmatici ca de ex. : euzina, fuxina acidă, verdele de lumină, etc.).

(+) coloranți bazici sau cationici care se atașează de structurile subcelulare încărcate negativ ; colorează structurile nucleare și de aceea se numesc coloranți nucleari (de ex. : hemalaunul, fuxina bazică, albastrul de toluidină, etc.).

(+) coloranți neutri , rezultă din amestecul în anumite proporții a unui colorant bazic și acid și colorează unele incluziuni citoplasmatice cu reacție neutră (ex. : eozinatul de azur de metilen, eozinatul de albastru de metilen).

2.4. Mecanismele colorării

Mecanismele fixării coloranților pe structurile celulare sunt foarte complexă, intervenind factori fizici și mecanisme chimice.

De exemplu, în reacțiile histo chimice proprii fiecărei grupe de substanță intervin mecanisme chimice.

Unele reacții și colorații se realizează prin factori fizici. Aceștia sunt :

(+) pătrunderea pur mecanică a colorantului în în interiorul unor structuri tisulare, prin osmoză sau capilaritate;

(+) adsorbția în fîlnită în colorațile diferențiale ale diferitelor elemente dintr-un tesut (unii ioni

sunt adsorbiți mai ușor decât alții);

+ absorbția, legată de structura fizică a constituenților celulari.

2.5. Principalele metode de colorare

1. după numărul coloranților utilizati, colorațiile se împart în două grupe:

+ simple cind se folosește un singur colorant, destinat punerii în evidență a nucleilor sau a altor structuri;

+ combinate care asociază doi sau mai mulți coloranți, în vederea colorării diferențiate a diverselor elemente dintr-un țesut (de ex.: hematoxilin-eozină).

2. după modalitățile de colorare se disting:

+ colorații progresive cind se oprește colorarea în momentul în care preparatul a ajuns la tentă dorită; oprirea se face prin spălare ;

+ colorații regresive ; secțiunea este supracolorată iar apoi excesul de colorant se elimină cu ajutorul unui diferențiator ; în final vor rămâne colorate selectiv mai multe structuri (ex.: colorația Nissl);

+ colorații pe bloc atunci cind piesele sunt colorate înainte de a fi incluse în parafină; sunt utilizate în impregnările metalice;

+ colorații pe secțiuni; colorarea secțiunilor lipite pe lame port obiect sau libere în soluția colorantă;

+ colorații directe în care colorantul vine în

contact direct cu secțiunea ;

+ colorații indirecte sau colorații prin mordan-
sare în care, pentru obținerea colorației este nece-
să prezența unui mordant (substanță care sensibilizea-
să țesutul la acțiunea colorantului).

2.6. Colorarea cu hematoxi- lin - eozină

Este cea mai utilizată colorație și are drept scop evidențierea în mare, a structurilor celulare, a identificării țesuturilor.

Deși nu este o colorație citologică, ea pune în evidență o serie de aspecte structurale orientative, pentru un examen histologic sau anatomo-patologic de rutină.

Timpii colorației sunt următorii :

- + deparafinarea secțiunilor în trei băi de xilol, toluol sau benzen ;
- + eliminarea solventului parafinei prin trecerea secțiunilor prin trei băi cu alcooluri de concentrație creșcindă (100% , 96% , 70%);
- + eliminarea alcoolului prin apă curgătoare;
- + introducerea secțiunilor hidratate într-o soluție de hemalaun (hematoxilină + iodat de potasiu + alaun de potasiu) timp de 5-10 minute;
- + spălare cu apă curgătoare 2-5 minute;
- + introducerea secțiunilor timp de 1-2 minute într-o baie cu soluție apoasă de eozină 1%;
- + spălarea secțiunilor timp de cîteva secunde în apă distilată ;

- + deshidratarea în alcooluri de concentrație crescindă pînă la alcool absolut;
- + clarificarea secțiunilor în trei băi cu xilot, timp de 5-10 minute;
- + montarea ; pe secțiunile colorate și clarificate se pune o picătură de balsam de Canada peste care se așează o lamelă de sticlă.

Rezultate : nucleii apar colorați în albastru violet, nucleolii în roșu, iar citoplasma în roz.

Etichetarea preparatului se face prin aplicarea unei etichete pe care se trece numărul de înregistrare din condică de lucru și țesutul sau organul recoltat și colorația făcută.



METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC IN MICROSCOPIA FOTONICA

Studiul caracterelor morfologice, chimice și enzimatiche se poate realiza și pe frotiuri și amprente.

(r) ~ 1

3.1. Frotiul

Se realizează prin întinderea celulelor care se găsesc în suspensie într-un mediu lichid (singe, spută, puroi, spălături gastrice, lichid pleural și peritoneal, etc) pe o lamă port-obiect.

Cel mai utilizat este frotiul cu material biologic fixat și colorat (frotiul de singe).

3.2. Frotiul de singe

Se face pe lame port obiect și comportă următorii timpi:

3.2.1. Prelevarea singelui se face prin pun-

V

A

at

A

ționarea părții laterale a pulpei degetului inelar sau medius cu un ac de injecție subcutanată bine sterilizat. Pielea se dezinfecțează și se degresează cu o compresă îmbibată în alcool sau eter.

Se apucă degetul subiectului cu mîna stîngă fixîndu-l între index și polce și se înteapă cu acul ținut în mîna dreaptă printr-o mișcare rapidă.

Prima picătură de sînge se șterge cu o compresă uscată deoarece ea poate conține lichide tisulare sau impurități de pe piele.

3.2.2. Efectuarea frotiului propriu zis

Constă în întinderea pe o lamă de sticlă perfect curată a picăturii de sînge într-un strat subțire, uniform. A doua picătură de sînge care apare pe pulpa degetului, se ridică cu marginea mică a unei lame șlefuite și se aplică pe una din extremitățile unei lame port-obiect așezată orizontal.

În momentul contactului cu lama port-obiect, se imprimă lamei pe care se află picătura de sînge o mișcare de lateralitate, pentru ca sîngele să se întindă pe linia de contact.

Este bine ca între cele două lame să se formeze un unghi de 35° după care se imprimă lamei șlefuite o mișcare de translacție în lungul lamei port obiect. (fig.3).

Grosimea frotiului de sînge depinde de :

+ mărimea picăturii de sînge (picătură mică - frotiu subțire);

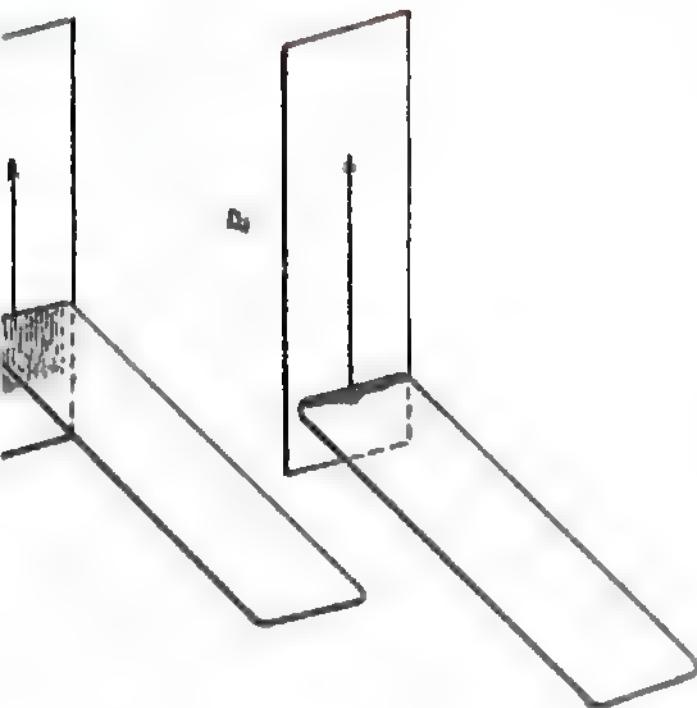
Fig.3. Tehnica efectuării rotiului de sănge



c

b

222



25

+ unghiul pe care-l formează lama șlefuită cu lama port obiect (este cu atât mai subțire cu cât acest unghi este de $30-35^{\circ}$);

+ viteza de întindere (printr-o viteză mare se obține un frotiu gros).

Un bun frotiu trebuie să fie subțire, să nu acopere toată lama, să aibă două margini laterale și să se termine în franjuri.

3.2.3. Fixarea frotiului se face prin :

a/ uscarea sau desicarea frotiului imediat după confectionarea sa; se face la temperatura camerei prin agitarea lamei (frotiu uscat); colorarea trebuie făcută cât mai repede posibil pentru a preveni alterările celulare și modificarea afinităților tinctoriale;

b/ soluții fixatoare (frotiu umed) ca alcoolul etilic absolut timp de 15 minute, alcool etilic absolut și eter în părți egale timp de 5-15 minute, alcool metilic timp de 2 minute sau prin vaporii de OsO_4 (soluție 2%).

3.2.4. Colorarea frotiului sanguin

Se face cu metoda May-Grünwald-Giemsa sau colorația panoptică Pappenheim.

Tehnica este următoarea:

+ lamele cu frotiul în sus se așeză pe suporti din bare de sticlă așezate paralel, în cutii Petri;

+ se acoperă frotiul cu un număr de picături din soluția May-Grünwald (eozinat de albastru de metilen) ținută trei minute, timp în care alcoolul metilic din soluție face fixarea preparatului;

+ se adaugă apoi un număr egal de picături de apă distilată neutră și se omogenizează cu o pipetă Pasteur; se lasă încă două minute, timp în care soluția hidro-alcoolică May-Grünwald acționează ca un colorant;

+ se îndepărtează soluția May-Grünwald prin inclinarea lamei și, fără spălare, se acoperă frotiul cu soluția Giemsa diluată (1-2 picături la 1 ml apă distilată neutră); după 20 secunde se îndepărtează și frotiul se acoperă din nou cu soluția Giemsa diluată care se ține 20-30 minute;

+ spălarea frotiului la un jet de apă;

+ diferențierea în apă distilată neutră timp de 1 minut;

+ se aşează lamele pe un stativ și se așteaptă uscarea lor.

Examinarea frotiului se face la microscopul fotografic utilizând obiectivul de imersie.

R e z u l t a t e :

- Eritrocitele au o culoare cărămizie
- Nucleii au o culoare violacee
- Nucleolii se colorează în albastru palid
- Granulațiile euzinofile se colorează în portocaliu iar cele bazofile în albastru-negru; neurofilele

în maron-închis iar azurofilele în roșu purpuriu.

Colorația May-Grünwald Giemsa colorează în violet-dezoxiribonucleoproteinele (A.D.N.) iar ribonucleoproteinele (A.R.N.) în diverse nuante de albăstru.

3.3. Frotiurile din materiale biologic provenit din organe ușor accesibile și care prezintă în mod fizic o descupamare permanentă sau intermitentă

Acestea se fac din secrețiile vaginale, mamare, bronșice, prostatice și celulele provenite din epitelii mucoaselor bucală, nazală, oculară.

Cu ajutorul unor spatule din sticlă sau metal, tampoane de vată sau tifon, se recoltează secrețiile care se etalează într-un strat subțire pe lame port-obiect degresate. Imediat după întinderea frotiului, fără a-l usca, lamele se introduc într-un amestec alcool-etic absolut și eter în părți egale timp de 15 minute. Se pot folosi și alte amestecuri fixatoare în raport de ceea ce dorim să obținem.

După fixare, frotiurile se pot colora cu May-Grünwald Giemsa sau hematoxilină-eozină.

3.4. Frotiurile cu material biologic provenit din organe mai puțin accesibile

Se fac din spălături gastrice, lichid pleural și peritoneal (pleurezie, ascită) etc.

În cazul în care aceste probe nu pot intra în lucru imediat, pentru conservarea celulelor este necesară fixarea lor. Cel mai bun fixator universal pentru fluide este soluția de alcool etilic 50%. Pentru aspiratele gastrice se folosește alcoolul etilic 95%.

Produsele care urmează a fi examineate, fixate sau nu, se centrifughează la 1500-4000 turății / minut timp de 10-30 minute. După centrifugare lichidul supernatant se îndepărtează iar din sediment cu o ansă sau pipetă se ia o picătură și se întinde pe o lamă degresată pe care s-a întins un strat subțire de albumină Mayer. Chiar dacă lichidele biologice recolțate au fost fixate cu soluția de alcool etilic 50%, frotiurile umede obținute din ele se fixează timp de 15 minute cu alcool etilic absolut - eter în părți egale.

3.5. Amprentele de organe

Organul de examinat se sectionează transversal prin zona care prezintă interes pentru diagnostic.

3.4. Frotiurile cu materiale biologice provenite din organe mai puțin accesibile

Se fac din spălături gastrice, lichid pleural și peritoneal (pleurezie, ascită) etc.

În cazul în care aceste probe nu pot intra în lucru imediat, pentru conservarea celulelor este necesară fixarea lor. Cel mai bun fixator universal pentru fluide este soluția de alcool etilic 50%. Pentru aspiratele gastrice se folosește alcoolul etilic 95%.

Produsele care urmează a fi examineate, fixate sau nu, se centrifughează la 1500-4000 turări / minut timp de 10-30 minute. După centrifugare lichidul supernatant se îndepărtează iar din sediment cu o ansă sau pipetă se ia o picătură și se întinde pe o lamă degresată pe care s-a întins un strat subțire de albumină Mayer. Chiar dacă lichidele biologice recolțate au fost fixate cu soluția de alcool etilic 50%, frotiurile umede obținute din ele se fixează timp de 15 minute cu alcool etilic absolut - eter în părți egale.

3.5. Amprente de organe

Organul de examinat se secționează transversal prin zona care prezintă interes pentru diagnostic.

Sectionarea se face cu un bisturiu sau o lamă ascuțită pentru a evita deformarea sau strivirea țesuturilor.

Cu ajutorul unei pense se prinde fragmentul ales și se apasă ușor cu fața sectionată pe lama port-obiect degresată. Se fixează cu alcool etilic absolut - eter în părți egale timp de 15 minute. Amprenta fixată se usucă și se colorează cu May Grünwald Giemsa.

1. P. 4:

4. METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC IN MICROSCOPIA FOTONICA

4.1. Indicatiile sectionării la gheată și criotom

Cu ajutorul microtomului de congelare și criotomului se pot obține :

- ✓ + secțiuni de țesut proaspăt, nefixat;
- ✓ + secțiuni de țesut fixat.

a/ Secțiunile de țesut proaspăt, nefixat se fac:

+ cind se impune un diagnostic anatomo-patologic ~~față de~~ ^{immediat} ~~urgent~~ (examen extemporan) care se poate pune în ~~moment~~ 15-30'; de acest diagnostic depinde tehnica operătorie;

+ cercetarea histochemicală a unor substanțe ca de exemplu grăsimile care sunt solubile în substanțele folosite în tehnica de includere la parafină (xilen, toluol, benzen, etc);

+ în cercetări de histoenzimologie.

b) Sectiunile de țesut fixat au indicații numeroase. Printre cele mai importante amintim:

+ examenul extemporaneu făcut pe fragmente introduse rapid în formol cald; procedeul este brutal dar dă rezultate mulțumitoare;

+ unele cercetări histochimice (catecolamine, vitamina D, etc.).

+ unele cercetări neurohistologice (metoda Benda-Spielmayer pentru mielină, Bielschowsky-Gross pentru terminațiile nervoase, etc.).

4.2. Tehnica sectionării

la microtomul de

congelare

Pe port obiectul microtomului se aplică o ronde
lă de hirtie de filtru bine îmbibată cu apă.

Pieselete fasonate din țesutul sau organul proaspăt, nefixat se așează pe rondela de hirtie de filtru umezită, fără a mai executa alți timpi. Fragmentele din țesut sau organ care au fost fixate în prealabil (cel mai utilizat fixator este formolul) trebuie bine spălate înainte de secționare deoarece, devin foarte sfărâmicioase.

Se va căuta pe cât posibil ca piesele să nu fie
mai groase de 0,5 - 0,8 cm. și să aibă suprafețele
parallele.

Inghetarea se face cu bioxide de carbon care se

găsește sub presiune în butelii metalice.

Se scoperă piesa și port-obiectul cu un pahar de sticlă și se deschide cu intermitență robinetul buteliei pînă cînd se formează atîta zăpadă carbonică cît să acopere preparatul.

Secțiunile se culeg de pe cuțit cu pulpa degetului printr-o mișcare de la bază spre tăiusul cuțitului, și se pun într-un recipient cu apă.

In cazul în care secțiunile nu pot fi prelucrate (colorate) ele pot fi păstrate în formol 10% la temperatură camerei sau la + 4°C timp de 1-2 zile.

4.3. Colorarea pentru examenul extemporaneu.

Secțiunile aflate în recipientul cu apă distilată sunt trecute cu ajutorul unei fine baghete de sticlă în "L" într-un Petri în care se află o soluție 0,5-1 % albastru de metilen sau albastru de toluidină.

Se lasă cîteva minute după care se spală într-un vas cu apă distilată, se pescuiesc pe o lamă port-obiect și se montează în glicerină.

Rezultate

După colorarea cu albastru de metilen, nucleii apar în albastru închis iar citoplasma în albastru deschis.



4.4. Lipirea sectiunilor

Lamele port-obiect după ce au fost acoperite cu un strat subțire de albumină Mayer, se lasă să se usuce la temperatură camerei timp de 15-30 minute. Se introduc oblic în vasul cu apă distilată unde se găsesc secțiunile care se pescuiesc pe lame cu ajutorul unei baghete de sticlă.

Se elimină excesul de apă prin sugativare și pre-sare ușoară cu o hîrtie de filtru, iar degradarea preparatului se evită prin colorarea lui rapidă.

Tehnica sectionării la gheătă se folosește la ora actuală doar pentru lucrări de rutină. Pentru cercetările citologice de finețe se folosesc tehniciile de secționare la criotom, criodesicăre (congelare-deshidratare) și congelare disoluție (congelare substituție).

4.5. Tehnica sectionării la criotom

Se deosebește față de tehnica precedență prin faptul că la acest aparat sectionarea nu este influențată de temperatură ambientă iar cuțitul și proba sunt menținute la o temperatură constantă de -12°C ... -36°C .

Aparatul este compus dintr-un microtom asemănător cu cel de parafină amplasat într-o incintă izotermă răcită de un agregat frigorific cu freon.



4.5.1. Tehnica de lucru

- 1 + fragmentul de țesut sau de organ nefixat așezat pe o rondea de hîrtie de filtru bine umezită este pus pe port-obiectul criotomului;
- 1 + port-obiectul cu piesa așezat vertical pe un suport metalic, este introdus într-un recipient special care conține un lichid refrigerent (în mod obisnuit azot lichid: temperatura 196°C);
- 1 + secționarea la grosimea de 5-10 microni;
- 1 + secțiunile care rămân întinse pe cuțit se plasează pe lame port-obiect, prin simplul contact dintre acestea și secțiune.

4.5.2. Indicatiile criotomiei

CClab

- + cercetări de citochimie;
- + cercetări de citoenzimologie;
- + cercetări de imunofluorescentă.

ملاعع (ملاعع)

4.6. Crio-desicarea

congelare - deshidratare.

Engleză

Principiul acestei metode precum și timpii ei au fost descriși la capitolul 1.3.

Indicatiile crio-desicării. Permite obținerea cu un minimum de alterări celulare a unor secțiuni subțiri și uniforme în care sunt conservați constituienții chimici. Pentru aceste motive metoda este folosită în studiul citologic și citoenzimologic. În his-

tehnice, metoda este folosită numai în studiul căruncularilor.

4.7) Metoda de congelare -

substituție

Principiul acestei metode este foarte apropiat de cel al metodei de congelare-deshidratare; conservarea substanțelor din celule este echivalentă.

in cell

4.7.1. Timpii de lucru.

- + Congelarea bruscă a unui fragment de țesut sau organ în azot lichid;
- + Substituția ghetii în transferul ei în alcool etilic absolut la temperaturi joase de -40°C pînă la -70°C timp de aproximativ 7 zile.
- + piesa împreună cu alcoolul în care s-a făcut substituția se lasă să revină la temperatura camerei;
- + includerea la parafină;
- + secționarea;
- + colorarea;

4.7.2. Indicațiile metodei

Prin această metodă se obține o foarte bună conservare a structurilor citologice și o conservare a numeroși componenti chimici.

Prin substituția în acetona s-au putut evidenția numeroase activități enzimatico-fosfataza alcalină

și acidă, succinidehidrogenaza, adenozintrifosfataza,
etc.

Se conservă foarte bine acizii nucleici și
glicogenul.

L.P.S.

5. METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC IN MICROSCOPIA ELECTRONICA

Prelevare, fixare, deshidratare și includere

5.1. Introducere

Unul din aparatele moderne indispensabile cercetării fundamentale și aplicative este microscopul electronic. Cu ajutorul lui se poate realiza:

- + examinarea curentă de rutină a celulelor și țesuturilor ;
- + studierea organitelor celulare prin tehnica de fracționare diferențiată ;
- + localizarea unor molecule prin tehnici de ultracitochimie ;
- + localizarea unor activități enzimaticice ;
- + reacții imunochimice la nivel ultrastructural, etc.

Tehnicile folosite în citologia folionică sunt inproprii cind prelucrăm un fragment de țesut sau

organ care urmează a fi examinat cu ajutorul microscopului electronic.

In cele urmează vom descrie tehnica folosită în laboratorul nostru de Microscopie Electronică.

5.2. Prelevarea

Pentru prevenirea modificărilor de orice natură la nivel celular, este recomandat ca probele de material biologic să fie recoltate din organismul viu sau imediat după sacrificarea animalului de experiență. (fixare post vitală).

Cele mai bune rezultate se obțin atunci cînd țesuturile și organele sunt perfuzate cu fixator înaintea sacrificării animalului de experiență, adică introducerea lichidului fixator în torrentul circulator (fixare intra vitală). *înțeles!*

Fragmentele de țesut obținute din punții sau biopsii, sau fragmentele mici din țesuturile organelor recoltate imediat după sacrificarea animalului de experiență, sunt puse pe față fără emulsia de azotat de argint a unei hîrtii fotografice.

Peste fragmentul de țesut sau organ se aplică 1 - 2 picături din lichidul fixator (glutaraldehidă tamponată) răcită la 4°C pentru a opri pe cît posibil acțiunea distructivă a enzimelor celulare (printroncincepe cît mai rapidă a fixării).

Din fragmentele recoltate cu ajutorul a două lame noi bine degresate, se confectionează fragmente mici, de formă cubică, cu latura de 1 mm.

Cu ajutorul unei scobitori se ridică fragmentele astfel prelevate și se introduc într-un flacon cu fixator răcit la + 4°C.

5.3. Fixarea

Ca și în cazul fixării pentru examinarea în microscopia fotonică, procesul de fixare în tehniciile de microscopie electronică asigură conservarea structurilor biologice cît mai aproape de starea lor funcțională, vie.

Fixarea se realizează cu ajutorul unor lichide fixatoare care determină formarea unor legături încrucișate între moleculele constitutive ale materialului prelucrat, care împiedică deteriorarea arhitectonicii ultrastructurale.

Dintre substanțele cu proprietăți fixatoare amintim: tetraoxidul de osmu (OsO_4), permanganatul de potasiu, formaldehida, glutaraldehida, etc. Aceste substanțe sunt folosite în amestec cu diverse soluții tampon (acetat veronal, cacodilat, fosfat etc.) cu scopul de a asigura amestecurilor fixatoare un-pH neutru și o miliosmolaritate cît mai apropiată de cea a mediului intern al organismului. (pH = 7,2 - 7,4 și 385 mOsm).

În laboratorul nostru de Microscopie Electronică folosim cu foarte bune rezultate, Fixatorul 251 (glutaraldehidă 2,5%) care se obține din:

- + glutaraldehidă distilată 10% 2 părți
- + tampon fosfat 0,1 M 5 părți
- + apă distilată 1 parte.

Glutaraldehida tamponată se păstrează la frigider și poate fi folosită numai două săptămâni de la data preparării.

Toți timpii fixării se fac la temperatura de $+4^{\circ}\text{C}$.

5.3.1. Metode de lucru

Fragmentele prelevate sunt introduse cu ajutorul unei scobitorii într-un recipient în care se află glutaraldehida tamponată, unde vor sta o oră (la frigider):

- + se îndepărtează fixatorul iar piesele se spălă de trei ori și cîte o oră cu tampon fosfat 0,15 M;
- + după înălăturarea celui de al treilea tampon fosfat 0,15 M, fragmentele sunt post-fixate timp de o oră în fixator Millonig, acest fixator se obține prin dizolvarea unui gram de tetraoxid de osmu în 100 ml tampon fosfat 0,15 M. Se poate folosi 1 - 2 săptămâni de la data preparării, ținut la întuneric și la frigider. ($+ 4^{\circ}\text{C}$).

خطف (جفاف)

5.4. Deshidratarea

Tehnicile de deshidratare au scopul de a îndepărta apă din fragmentele fixate. În cazul în care fixarea s-a făcut în condiții bune, deshidratarea nu produce modificări în fragmentele recoltate.

În procesul de deshidratare, apă din piesă este înlocuită treptat prin trecerea acestora prin băi succesiive cu alcool sau acetonă în concentrație crescîndă

Algearea substanței deshidratante este în funcție de materialul de includere, deoarece acesta trebuie să fie miscibil cu agentul de deshidratare: în cazul folosirii vestopalului se folosește acetonă iar în cazul Eponului - alcoolul etilic.

Timpii sănt următorii :

- + acetona sau alcool etilic 30 % 2'
- + acetonă sau alcool etilic 50 % 2'
- + acetona sau alcool etilic 70 % 30'
- + acetona sau alcool etilic 90 % 30'
- + acetona sau alcool etilic 100 % 30'
- + acetona sau alcool etilic 100 % 30'
- + acetona sau alcool etilic 100 % 30'

Ultimile două băi cu acetona sau alcool etilic absolut se țin la temperatura camerei.

5.5. Includerea

Metodele de includere folosite în microscopia fotonică se pot folosi și la includerea țesuturilor ce urmează a fi studiate la Microscopul electronic.

Substanțele folosite la includere pentru microscopia electronică trebuie să prezinte următoarele calități:

- + să fie solubile în substanțele de deshidratare
- + să poată pătrunde ușor în fragmentele de țesut sau organ;
- + să fie transparente pentru a permite centrarea piesei și fasonarea blocului în vederea secțiunii.

- + în urma polimerizării să facă mai compactă cu piesa;
- + să polimerizeze fără modificări de volum care să modifice forma piesei;
- + să aibă o anumită duritate care să permită o bună secționare; ~~cu~~ ^{cu} ceruri

Substanțele de includere folosite la noi fac parte din grupul rășinelor poliesterice (Vestopalul) sau a rășinilor epoxidice (Epon 812).

5.5.1. Includerea în Vestopal

Vestopalul polimerizează (se întărește) cu ajutorul unui inițiator sau catalizator (peroxidul de benzoil) și a unui activator (naftenat de cobalt).

Vestopalul de lucru se prepară în timpul deshidratării pieselor și din el se fac, în acetonă absolută, trei concentrații diferite în care piesele sunt ținute cîte o oră.

+ Vestopal I	- o parte Vestopal
	- 3 părți acetonă absolută
+ Vestopal II	- 2 părți Vestopal
	- 2 părți acetonă absolută
+ Vestopal III	- 3 părți Vestopal
	- 1 parte acetonă absolută

În Vestopalul de lucru fără acetonă absolută, piesele se țin 12 - 24 ore, sticluța nemaiavînd dop.

Capsulele în care se face includerea propriu zisă și care sunt confectionate din gelatină sau polietylénă sunt ținute în termostat la 37°C - 60°C pentru

(44)

pentru a pierde apa.

In aceste capsule așezate perpendicular pe un suport se introduce o picătură de Vestopal de lucru pe marginea lor, pentru a evita formarea bulelor de aer.

Cu ajutorul unei scobitori în fiecare capsulă se introduce un singur fragment din țesut care se așează central; se introduce eticheta cu numărul cauzului și apoi se umple capsula cu Vestopal.

Suportul cu capsule este așezat în termostat la 60°C unde polimerizarea Vestopalului se face în 24 - 48 ore. La sfîrșitul polimerizării blocul trebuie să fie transparent, să conțină în vîrful său piște care este de culoare neagră (datorită post-fixării cu tetraoxid de osmu) și să fie suficient de dur.

PRE-FIXARE **SPĂLARE** **POST-FIXARE** **DESHIDRATARE**

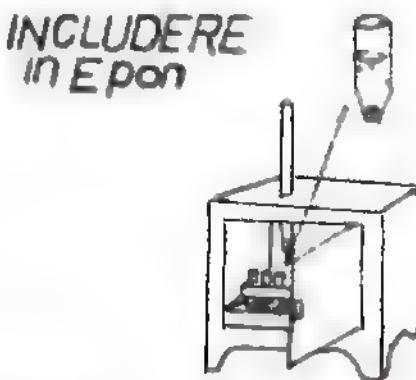
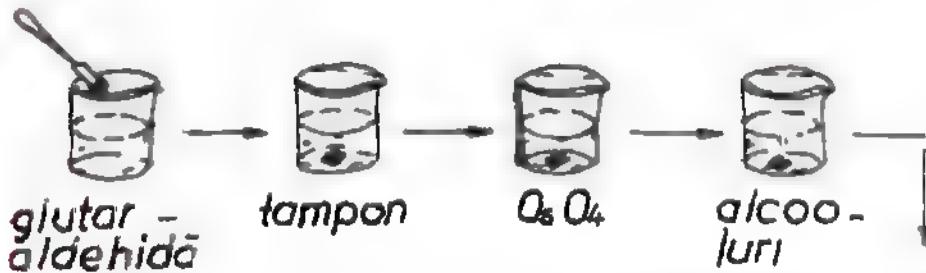


Fig.4. Fixarea și includerea în Epon.

6

METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC IN MICROSCOPIA ELECTRONICA

Sectionarea si aplicarea sectiunilor pe port-obiect

Contrastarea sectiunilor

6.1. Sectionarea

Pentru a putea fi examinate la microscopul electronic, piesele trebuie secționate cu ajutorul unor aparate de construcție specială, numite ultramicrotoame.

Există două tipuri de ultramicrotoame:

+ Ultramicrotoame cu expansiune mecanică (Porter-Blum) care au același principiu de funcționare ca și microtoamele de parafină;

+ Ultramicrotoame cu expansiune termică care funcționează pe baza principiului de dilatare termică (L.K.B. Reichert) ; tija metalică care servește drept suport pentru blocul cu piesa de organ ce urmează să fie secționată, are înfășurată pe ea o bobină; la trecerea unui curent electric tija se încălzește, se dilată și transmite dilatarea ei, deplasându-se

către cuțitul care este fix. Concomitent cu mișcarea orizontală, tijei î se imprimă și o mișcare verticală de sus în jos.

6.2. Fasonarea blocului. Pentru ca fragmentul de țesut sau organ să poată fi secționat, trebuie mai întâi îndepărtată capsula de gelatină cu polietilenă aceasta se realizează printr-o tăietură cu lama de-a lungul ei și înălțăturarea ei.

Blocul astfel obținut se fixează într-un port-bloc, după care urmează fasonarea lui, adică obținerea unei piramide în al cărei vîrf trebuie să se găsească materialul de secționat.

Fasonarea se face cu ajutorul unei lame de ras și sub lupă binoculară. În timpul confectionării piramidei unghiul de iluminare al blocului trebuie astfel ales încât imaginea prin lupă să permită o cît mai bună vizualizare a suprafeței de secționat.

Prima secțiune este orizontală, îndepărându-se o calotă subțire de vestopal de la vîrful blocului pînă la piesă. Prin patru tăieturi oblice în jos și în afară se obține piramida a cărui vîrf trunchiat trebuie să aibă forma unui pătrat cu latura de 0,1 - 0,2 mm. O suprafață mică de secțiune permite obținerea unor secțiuni uniforme și subțiri.

6.2.1. Sectionarea propriu zisă. se realizează cu ajutorul unor cuțite speciale confectionate din oțel, sticla, diamant. Cele mai utilizate sunt cuțitele din sticla specială, cît mai dură.

Pentru confectionarea cuțitelor din sticlă se folosește un aparat special numit knife - maker. Muchia cuțitului trebuie să fie orizontală și examinată la lupă, trebuie să apară ca o dungă subțire, luminoasă, lipsită de asperități.

Pe vîrful utilizabil al cuțitului (care are formă triunghiulară) se confectionează un bazin mic numit în mod curent "bac", folosind bandă de leucoplast sau scotă.

Blocul se umple cu o cantitate suficientă de apă distilată care trebuie să atingă muchia cuțitului.

Unghiul de înclinare a cuțitului față de suprafața blocului trebuie să fie de aproximativ 2-3 grade.

Aceste pregătiri terminate, se pune în funcțiune ultramicrotomul. La fiecare cădere a blocului, pe cuțit trebuie să apară o nouă secțiune ce o împinge pe cea precedentă, astfel încât secțiunile obținute se întind ca o bandă pe suprafața apei distilate din bac.

Examinarea mersului secționării și a benzii de secțiuni obținute se face cu ajutorul unei lupe binoculare montate la ultramicrotom. Iluminarea bacului și a conținutului său se face cu o șursă de lumină rece (lampă fluorescentă) pentru a evita eventualele dilatări ale blocului sau cuțitului.

Grosimea secțiunilor se poate aprecia după culoarea de interferență pe care o prezintă în momentul secționării : secțiunile ultrafine au o cu-

loare galben - păi și corespund unei grosimi de 250-300 Å.

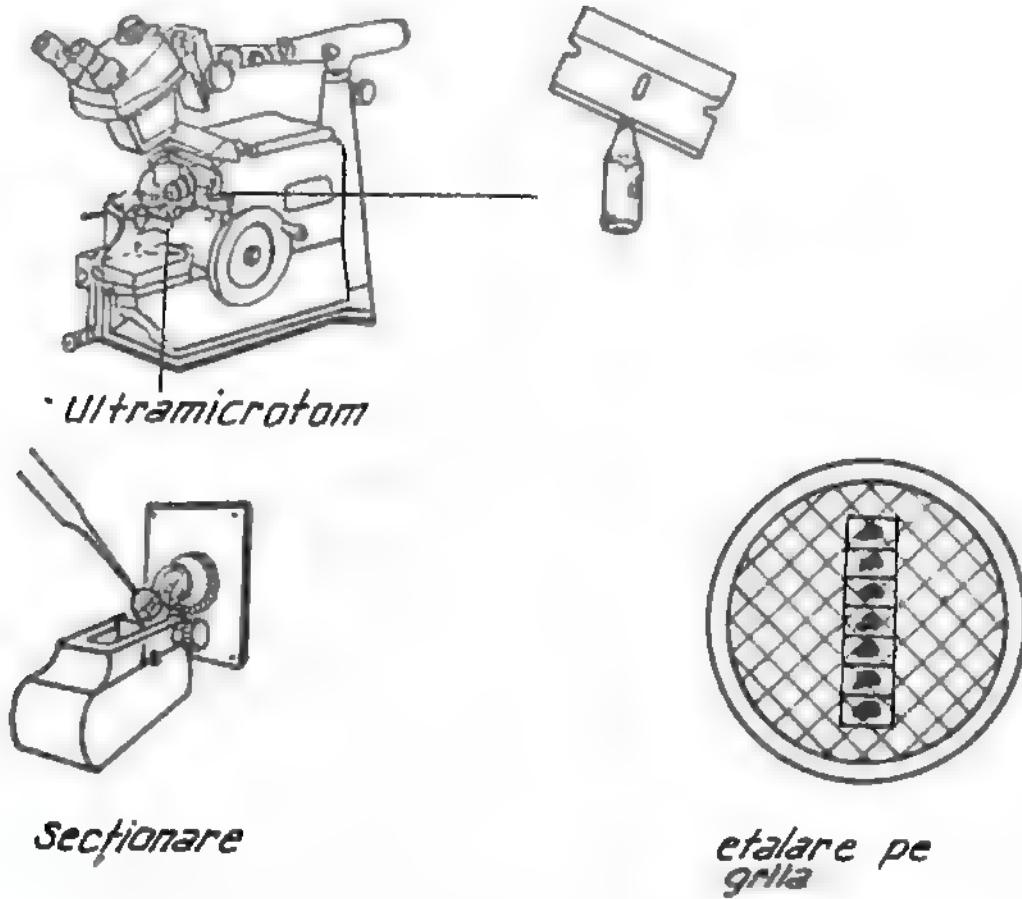


Fig.5. Secționarea și etalarea secțiunilor pe grilă

6.2.2. Secțiunile semifine care se fac tot cu ajutorul ultramicrotomului, folosind însă șvansul manual : au o grosime de 1500-3200 Å.

Secțiunile semifine se culeg cu o ansă de sîrmă foarte subțire și se aşază pe o lamă foarte curată. Apa adusă odată cu secțiunile este înlăturată prin încălzirea lamei la flăcără pînă la evaporarea ei; căldura mărește aderența secțiunilor pe lamă.

Locul rămas după evaporarea apei (unde se găsesc secțiunile semifine) se acoperă cu cîteva picături dintr-o soluție de albastru de toluidină 1 %. Lamele cu colorantul pe ele se pun în termostat la 60°C unde se lasă 10-30 minute, după care se spală la un jet mic de apă curgătoare. Se sugativează și se examinează la microscopul fotonic.

Cu ajutorul secțiunilor semifine care se fac înaintea celor ultrafine se localizează zona care interesează și se verifică dacă blocul respectiv conține elementele pe care ni le-am propus să le examinăm.

6.3. Aplicarea secțiunilor pe port-obiect

Spre deosebire de microscopia fotonică, în microscopia electronică se folosește un port-obiect pentru secțiuni foarte fine alcătuit din două componente:

- + o grilă metalică și
- + o peliculă de natură organică care acoperă suprafața grilei.

6.3.1. În prezent se folosesc grile confeționate pe cale electrolitică: din cupru, nichel, argint, aur, platină, tungsten, cu diametrul de 2,3 - 3 mm. Ochiurile acestei grile au formă pătrată.

Criteriul de identificare a grilelor este "mesh"-ul (exemplu : 75 - 400 mesh) ; mesh-ul reprezintă numărul de ochiuri pe un "inch" , adică

2,54 cm. Grilele de 75, 100 și 150 mesh se utilizează foarte rar deoarece au ochiuri foarte mari și pelicula cu care sunt acoperite nu rezistă la fluxul de electroni. Grilele de 300 - 400 mesh se pot utiliza fără peliculă.

6.3.2. Grilele cu 75 - 200 mesh, pentru a constitui suportul ideal pentru preparat, trebuie să fie acoperite cu o peliculă fină (până la 200 μ grosime), transparentă și rezistentă la fluxul de electroni.

Pelicula se obține dintr-o serie de substanțe dizolvate în solventi organici. Pentru confectionarile noi folosim parlodiumul 1% în acetat de amil.

Tehnica pentru obținerea peliculelor este următoarea: un cristalizator din sticlă curat, cu diametrul de 20 cm și înălțimea de 8 cm se umple cu apă distilată proaspătă; cu ajutorul unei micropipete se lasă să cadă pe suprafața apei de la o mică distanță o picătură din soluția de parlodium 1%. Picătura se întinde instantaneu pe suprafața apei și după cîteva minute, cînd solventul a fost eliminat prin evaporare și difuzare în apă, membrana capătă o rezistență suficientă pentru a putea fi utilizată.

Cu o pensă foarte fină se așează grilele pe peliculă, în rînduri paralele după care sunt culese cu ajutorul unei hîrtii poroase (hîrtie de ziar); grilele astfel obținute se pun într-o cutie Petri acoperită cu o hîrtie de filtru pentru a le feri de praf.

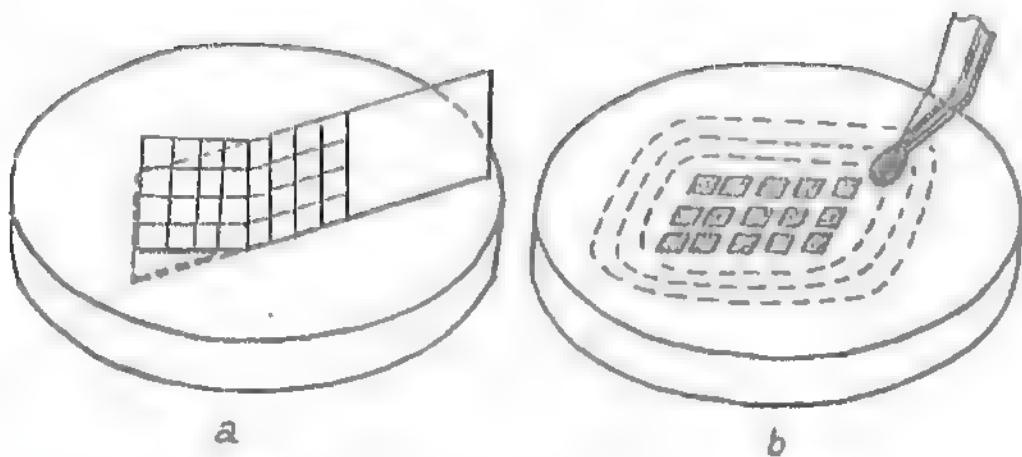


Fig. 6. Formarea peliculei și depunerea ei pe grile.

Grilele pot fi utilizate imediat după uscare, adică după 24 de ore. Pentru a mări rezistența mecanică a peliculelor la fluxul de electroni, pe suprafața lor se depune un strat subțire și uniform de carbon. Acest lucru se realizează cu ajutorul aparatelor de metalizare, prin vaporizarea carbonului cu ajutorul unui arc voltaic realizat între doi electrozi de carbon. Evaporarea trebuie să aibă loc la un vid înaintat de 10^{-5} - 10^{-6} Torr.

6.3.3. Secțiunile ultrafine se culeg de pe suprafața apei din bac prin aplicarea deasupra lor, cu ajutorul unei pense fine a feței grilei acoperită cu peliculă. Prin îndepărțarea apei cu ajutorul hârtiei de filtru, secțiunile aderă puternic la peliculă. Grila cu preparatul în sus se plasează într-o cutie Petri, pe fundul căreia se află hârtie de filtru;

pe aceasta se scrie numărul blocului.

Se acoperă Petri-ul cu capac și se lasă grilele să se usuce după care se poate face contrastarea secțiunilor.

6.4. Contrastarea.

Pentru a mări contrastul secțiunilor de țesuturi și organe se face colorarea lor pozitivă. Ea se realizează cu compuși ai unor metale grele (oxizi, hidroxizi, acizi, săruri).

In Laboratorul de Microscopie Electronică se practică o dublă contrastare, cu acetat de uranil și cu citrat de plumb.

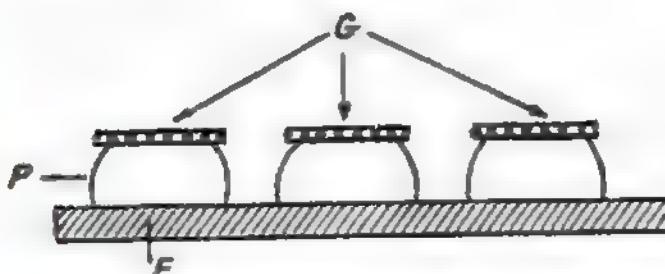


Fig.7 - Contrastarea secțiunilor.

6.4.1. Contrastarea cu acetat de uranil.

Cu o pipetă se umplu godeurile făcute pe o placă de plexiglas cu o soluție de acetat de uranil 13 %.

Fața grilelor pe care sănt secțiunile se aplică pe suprafața picăturilor din godeuri pentru 10 minute și la întuneric. Se spală apoi grilele trecindu-se prin trei băi cu alcool 50%. Lichidul de pe grilă se sugativează cu hârtie de filtru.

6.4.2. Contrastarea cu citrat de plumb. (solutia Reynolds) se face imediat după prima.

Pe o placă de parafină se pun atîtea picături de soluție Reynolds cîte preparate sănt de colorat. Peste aceste picături se pun grilele cu preparatul în jos și se țin 3 minute după care se spală cu apă bidistilită.

Se îndepărtează apa cu o hârtie de filtru după care preparatele se pot examina la Microscopul electronic.

7. METODE CURENTE DE CITOCHIMIE

7.1. Introducere

Prin citochimie se înțelege identificarea și localizarea pe preparate histologice a unor constituenți chimici celulare.

Aplicarea tehniciilor de citochimie face posibilă localizarea căt mai exactă la nivel celular sau tisular a substanțelor cercetate, realizându-se concomitent o analiză chimică și una morfologică (topochimie).

Metodele citochimice trebuie să îndeplinească două condiții esențiale :

- + să facă posibilă identificarea specifică și constantă a substanței, chiar dacă aceasta se află în cantități foarte mici;

- + localizarea topografică precisă a substanței cercetate.

7.2. Recoltarea pieselor

Se face în aceleasi condiții ca cele expuse în capitolul 1.2. → pag 5

7.3. Fixarea

În citochimie, fixarea se realizează prin:

7.3.1. Agenti fizici adică criofixare, cri-

deshidratare și criosubstituție.

În fixarea prin agenți fizici, factorul esențial îl reprezintă congelarea cît mai rapidă a pieselor la temperatură cît mai scăzută.

Avantajele fixării prin agenți fizici sunt următoarele :

+ oprește orice activitate enzimatică, împiedicând astfel autoliza celulară post-mortem.

+ conservarea structurilor celulare echivalează cu cele mai bune fixări chimice pentru citologie.

+ deplasarea substanțelor solubile sau difuzibile este mai redusă decât în orice alt procedeu de fixare.

7.3.2. Fixarea prin agenți chimici trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

+ să nu deplaseze dintr-un sector în altul substanțele de cercetat;

+ să nu le dizolve;

+ să nu le modifice structura chimică

+ să permită desfășurarea normală a reacțiilor chimice care urmează să fie aplicate.

Trebuie subliniat faptul că nu există un agent fixator chimic pentru conservarea tuturor substanțelor evidențiabile prin reacții citochimice.

Un fixator dat poate conserva într-o măsură mai mare sau mai mică anumite substanțe dar concomitent, prin solubilizare el poate îndepărta parțial sau total alte substanțe.

7.3.3. Durata fixării este mult mai strictă în citochimie și citoenzimologie deoarece ea este dictată de eventuala acțiune extractivă a fixatorului asupra unor componente chimici.

7.3.4. Volumul fixatorului va fi suficient de mare pentru a împiedica diluarea lui cu apa din piese; el va fi schimbat de 1-2 ori în decursul fixării.

7.3.5. Temperatura fixatorului influențează atât procesele de autoliză celulară cît și viteza de pătrundere în piesă. Se preferă fixarea la rece (0°C - $+ 4^{\circ}\text{C}$) care previne autoliza dar mărește durata fixării.

7.3.6. p.H-ul fixatorilor va trebui să fie cît mai apropiat de valorile fiziole (p.H = 7,2-7,4)

7.4. Includerea

Efectul tuturor factorilor implicați în procesul de includere (solvenți organici, temperatură, durată, etc) asupra diferenților constituenți chimici celulares trebuie bine cunoscut deoarece, ceea ce s-a păstrat corect prin fixare, se poate pierde la includere.

Cele mai multe din metodele de citochimie și citoenzimologie se realizează prin tehnica criotomiei iar cele care folosesc fixatori chimici se realizează prin includere la parafină.

7.5. Sectionarea

Pentru piesele incluse la parafină, secționarea se face în modul cunoscut din tehnica descrisă la capitolul 1.6.

Pentru fragmentele fixate prin agenți fizici se utilizează secționarea descrisă la capitolul 1,6 și 4.5.

7.6. Lipirea secțiunilor

Se face cu diverse soluții : de albumină, glicerină, albumină-glicerină (Mayer), amidon, gelatină, etc.

Soluția pentru lipirea secțiunilor pe lama port obiect trebuie aleasă în funcție de reacția citochimică ce urmează să se facă. De exemplu în reacțiile pentru glicogen, etc, lipirea cu aceste substanțe este contraindicată; în aceste situații, lipirea se face prin procedeul uscat.

7.7. Reacțiile pentru evidențierea substanțelor

Au drept scop final furnizarea la examenul microscopic al preparatului, a unui semnal care, să ne informeze corect asupra prezenței unei sau unui grup de substanțe.

Din numărul mare al reacțiilor citochimice numai unele pot fi echivalente cu reacțiile de microchimie analitică.

În mareea lor majoritate aceste reacții evidențiază doar grupe de substanțe și mai ales radicali.

sau funcții chimice. Există reacții citochimice care evidențiază doar o anumită proprietate chimică legată de anumiți radicali sau funcții chimice ca de exemplu proprietatea reducătoare, oxidantă, bazofilia, metacromazia, etc.

În lucrările curente de citochimie, aprecierea rezultatelor se face de obicei numai sub aspect calitativ, adică substanța cercetată este prezentă sau absentă, completindu-se cu observații de ordin cantitativ, adică precizând că substanțele respective se află în cantitate foarte redusă (F), moderată (+), mare (++) , foarte mare (+++) sau absentă (-).

7.7.1. Evidențierea histochemicală a unor substanțe minerale.

Se efectuează datorită importanței lor în cito-fiziologie, morfopatologie, toxicologie, medicină legală, etc.

De exemplu fierul, element cu o deosebită importanță biologică, prezintă un interes major atât pentru citologi cât și pentru morfopatologi. În țesuturile animale fierul se află sub două forme:

- + fierul ionic (Fe^{+++}) ușor de pus în evidență prin metode foarte specifice și sensibile;
- + fierul mascat, evidențierabil prin metode chimice dar după folosirea unui procedeu de demascare.

Se recomandă fixarea în formol neutru 10% sau Bouin și includerea la parafină.

Tehnica de evidențiere a fierului ionic se bazează pe următorul principiu: în mediul acid, ionii ferici (Fe^{+++}) reacționează cu ferocianura de potasiu formând un precipitat albastru de ferocianură ferică sau albastru de Prusia. (De examinat la microscop cu obiectivul lo sețiumi prin pulmon hemoragic colorat cu metoda albastrului de Prusia (Perls). Se observă granule de culoare albastră (Fe^{+++}), iar nucleii de culoare roșie.

7.7.2. Evidențierea histo chimică a glucidelor.

Glucidele sunt aldehyde-cetone a unor alcooluri polihidroxilice și joacă un rol deosebit în activitatea celulară. Ele pot fi substanțe energetice de prim ordin (exemplu: glicogenul), iar prin combinarea lor cu proteinele formează glicoproteinele ce la rîndul lor intră în alcătuirea glicocalixului. Ele pot fi evidențiate prin următoarele metode:

1. Studiul metacromaziei. Colorarea selectivă a anumitor structuri celulare sau tisulare în alte nuante decât cea a soluției colorante se numește reacție sau colorație metacromatică.

Valoarea ei formativă a metacromaziei este mai mare decât cea a bazofiliei deoarece ea indică pe lîngă prezența grupărilor acide dintr-o substanță dată, densitatea și chiar natura acestora.

Substanțele care răspund la reacția metacromatică fac parte din următoarele trei grupe: mucopolizahride, acizi nucleici și lipide cu caracter acid.

Cei mai folosiți coloranți metacromatici sunt cei

tiazimici iar dintre aceştia, în special albastrul de toluidină, albastrul de crezyl, azur A, etc.

Pentru studiul metacromaciei se pot folosi și secțiunile semifine făcute din preparatele pentru microscopie electronică.

În mod curent se folosește albastrul de toluidină 0,1 - 0,25 % în apă distilată și 1% pentru secțiunile semifine.

Preparat. - Pe secțiunile semifine, structurile metacromatice sunt colorate în roșu-violaceu.

2. Evidențierea glicogenului a mucopolizaharidelor neutre, a glicoproteinelor și a glicolipidelor se face cu ajutorul reactiei P.A.S. (reactia acid periodic- Schiff).

Preparat - Pe secțiunile de rinichi embrionar, substanțele P.A.S. pozitive se colorează în roșu violaceu.

7.7.3. Evidențierea histochimică a lipidelor.

Lipidele, cu rol important în metabolism, pot fi și ele evidențiate cu ajutorul reacțiilor histochimice.

Ca și în cazul glucidelor în evidențierea histochimică a lipidelor se apelează la reacții sau colorații generale, reacții pentru anumiți radicali (carbonil, sterol), reacții pentru evidențierea caracterului acid, netratrat, etc., reacții pentru componenta glucidică, protidică.

61

Colorațiile generale pentru evidențierea lipidelor totale se fac cu ajutorul lizocromilor (Sudan, Scharlach, Oil Reed, etc.); aceste substanțe dau puține indicații referitoare la constituția chimică a lipidelor, evidențierea lor fiind bazată doar pe dizolvarea lizocromilor în acele lipide care la temperatură laboratorului rămân în stare lichidă.

Pentru colorarea generală a lipidelor totale se folosește formolul neutru 10%.

Deoarece lipidele sunt solubile în solventi organici ca xilolul, toluolul, benzenul, includerea nu se poate face la parafină; colorarea se va aplica pe secțiunile făcute la microtomul de gheată.

Preparat. Secțiunile de ficat colorate cu Sudan III sau IV, prezintă lipidele totale colorate în roșu.

7.7.4. Evidențierea histochimică a proteinelor.

Proteinele constituie partea cea mai importantă de substanțe organice din celule. Ele se clasifică în:

- + aminoacizi (substanțe cu caracter amfoter)
- + peptidele (combinarea dintre doi sau mai mulți aminoacizi).
- + holoproteine sau proteine (sunt formate numai din aminoacizi).
- + heteroproteine (conțin în afară de aminoacizi și alte substanțe ca de exemplu glucide și lipide).

Metodele bazate pe reacții histochimice se

grupează în :

- + reacții generale pentru proteine totale;
- + reacții de grup care evidențiază un anumit număr de grupări reactive;
- + reacții pentru grupări speciale (tirozină, triptofan, arginină, etc);
- + reacții de identificare prin blocaj specific.

Acizii nucleici sau nucleoproteinele cu o mare importanță biologică, se pot evidenția pe secțiuni histologice.

Metodele de evidențiere pot demonstra prezența diferențelor componente ale acestora; bazele purinice, pirimidinice, riboza și dezoxiriboza, acidul fosforic și fractiunea proteică (proteine histone și nehistone)

Rezultatul reacțiilor depinde în mare măsură de pretratamentul pieselor și în special de fixare. Fixatorii indicați sunt cei precipitanți, în special alcoolul, amestecurile pe bază de alcool și acid acetic (fixatorul Carnoy). Acestea fiind un amestec acid, realizează prin precipitarea nucleoproteinelor o bună fixare morfologică.

Pentru evidențierea acizilor nucleici se folosesc metoda lui Brachet care utilizează doi coloranți bazici: verdele de metil și pironina.

Preparat. Pe secțiunile colorate cu metoda lui Brachet, A.D.N.-ul se colorează în verde (colorație nespecifică - colorația specifică a A.D.N.-ului se face cu metoda Feulgen, el căpătind o culoare roz - roșu), iar A.R.N.-ul în roșu.

12-
O → C

8. METODE CURENTE DE CITOENZIMOLOGIE

8.1. Introducere

Enzimele sunt compusi chimici care catalizeaza reacțiile de sinteza și degradare din substanța vie. Ele sunt aşadar biocatalizatori care joacă un rol fundamental în reglarea proceselor metabolice ; intervin deasemeni în toate procesele de creștere și regenerare tisulară.

În celulă, enzimele se găsesc fie absorbite pe anumite structuri, fie dispersate omogen în citoplasmă.

Evidențierea prezenței enzimelor se face prin metode biochimice (vezi 8.3.) iar decelarea unei activități enzimatice se face prin metode histatopochimice. Cu alte cuvinte, prin metodele de histoenzimologie se pune în evidență "o activitate enzimatică" și nu enzima ca atare.

Metodele histoenzimologice pun în evidență existența produsului de reacție, rezultat al acțiunii unei enzime asupra unui substrat. Cazul ideal din punct de vedere histoenzimologic este ca produsul de reacție să fie insolubil (pentru a nu difuza din locul în care s-a produs reacția) și colorat pentru a putea fi observată în microscopie prezența lui.

8.2. Metode citoenzimologice

Principalele etape ale obținerii preparatului pentru reacții enzimaticе sunt, în parte asemănătoare cu cele din citologia clasică (recoltare, fixare, secționare, montare) dar prezintă două etape caracteristice: incubarea și vizualizarea.

8.2.1. Recoltarea. Spre deosebire de citologia clasică, reacțiile histoenzimologice se pot face numai pe fragmente de țesuturi sau organe recoltate "in vivo" (prin biopsie sau la foarte scurt timp după sacrificarea animalului).

8.2.2. Fixarea. In mod obisnuit se folosesc secțiunile făcute la criotom. În cazul în care se folosesc lichide fixatoare, fixarea se face la rece (0° - $+4^{\circ}\text{C}$) timp de maximum 18 - 24 ore (prelungirea duratei de fixare produce artefacte prin difuziunea enzimelor).

8.2.3. Incubarea, reprezintă cea mai importantă etapă din tehnica histoenzimologică.

Scopul principal al incubării este de a oferi enzimei a cărei activitate urmează să fie evidențiată, un substrat imbogățit artificial prin adăugarea la mediul de incubație a substratului adecvat enzimei respective. Acest lucru se face cu scopul de a mări viteza de reacție în sensul formării produsului "enzimă + substrat", chiar dacă enzima se află în cantități foarte mici. Cuplul enzimă + substrat reprezintă de fapt activitatea enzimatică.

Un alt scop al incubării este acela de a face insolubil produsul de reacție (enzimă + substrat).

Enzimele prezintă două fracțiuni:

- + o fracțiune hidrosolubilă numită lioenzimă;
- + o fracțiune liposolubilă numită desmoenzimă.

Lioenzimele se pierd în timpul diferitelor manopere de obținere a preparatului histoenzimatic, evidențiindu-se numai desmoenzimele.

Dacă produsul de reacție (enzimă + substrat) este solubil așa cum se întâmplă în cazul hidrolazelor atunci el trebuie transformat într-un produs insolubil printr-un procedeu numit "captură". De exemplu dacă produsul de reacție este un anion (fosfat, carbonat), el devine insolubil prin captura de ioni metalici (plumb).

Pentru realizarea acestor scopuri, mediul de incubare trebuie să conțină :

+ substratul specific (natural sau sintetic) al enzimei a cărei activitate urmează a fi pusă în evidență (exemplu de substrat sunt sărurile de tetrazolin, folosite pentru decelarea activității oxidoreductazei);

+ substanța care asigură insolubilizarea produsului de reacție (exemplu: în cazul fosfatazelor, prin hidroliză enzimatică se eliberează anionul fosfat care este precipitat prin "captura" de cationi de Ca^{++} pentru fosfataza alcalină și plumb (Pb^{++}) pentru fosfataza acidă; acești "cationi de captură" se adaugă mediului de inoabătie sub formă de clorură de calciu și respectiv azotat de plumb);

+ substanță care asigură în timpul incubației vizualizarea activității enzimatice (exemplu sulfura de amoniu va forma în cazul fosfatazei acide sulfură de plumb, substanță cromoforă de culoare brun închis); ea poate fi vizualizată microscopic și indică histotopochimic activitatea enzimatică a fosfatazei acide.

Se acordă o atenție deosebită pH-ului mediului de incubare deoarece activitatea fiecărei enzime se desfășoară la un anumit pH optim de acțiune.

O importanță deosebită o are timpul de incubație. S-a constatat că saturarea enzimei cu substrat se face în 20 minute; se recomandă totuși tatonarea timpului optim de incubare.

8.2.3. Vizualizarea. Prin vizualizarea activității enzimatice se înțelege observarea la microscop a unei anumite culori, cu aspect granular sau difuz.

Aceasta indică în principiu locul activității enzimatice (aspectul histotopochimic al vizualizării și prezintă o anumită intensitate tinctorială care demonstrează intensitatea activității enzimatice (aspectul de histoenzimologie cantitativă a vizualizării).

Pentru a fi siguri de specificitatea reacțiilor este necesară efectuarea unor preparate de control. Preparatele de control sunt aceleia în care, prin diferite procedee, se include sau se inhibă activitatea enzimatică.

În momentul de față există metode pentru evidențierea activității următoarelor grupe de enzime:

I. Enzimele din grupul oxidoreductazelor fac parte din grupa mare a enzimelor care catalizează procesele de oxidare și reducere din celula vie. Reacțiile de oxidoreducere sunt printre cele mai importante procese ale transformărilor biochimice deoarece ele produc cea mai mare parte de energie liberă de care are nevoie celula pentru realizarea activității sale fiziologice normale.

Prin acțiunea catalitică a acestor enzime, celula degradesă pe cale oxidoreductoare componentele nutritive ajunse la ea. Energia potentială a acestor componente eliberată în urma reacțiilor de oxido-reducere este depozitată în compuși macroergici și folosită ulterior pentru realizarea trăvăliului celular.

De exemplu activitatea succinidehidrogenazei se poate pune în evidență prin metoda NACHLAS-SELIGMAN. Prințipiu este următorul: succinidehidrogenaza eliberează hidrogenul din sărurile acidului succinic pe care le transformă în fumarat: hidrogenul eliberat este acceptat de o sare de tetrazolin care se reduce în formazan insolubil și colorat.

II. Hidrolazele sunt enzime care catalizează reacțiile de scindare a moleculelor cu fixarea componentelor apei la produsele de scindare. De exemplu desfacerea proteinelor în aminoacizi, a polizaharidelor în monozaharide, a lipidelor în acizi grași și gliceră, sunt toate reacții hidrolitice.

Din grupul hidrolazelor face parte și fosfataza alcalină, activitatea ei se pune în evidență prin metoda

GOMORI-TAKAMATSU principiul este următorul: enzima descompune beta-glicerofosfatul de sodiu în glicerină și acid fosforic. Acidul fosforic intră în reacție cu clorura de calciu în urma căreia se formează fosfatul de calciu insolubil care apoi este transformat în fosfat de cobalt cu ajutorul unei soluții de clorură de azotat de cobalt; prin prelucrarea secțiunilor cu sulfura de amoniu, fosfatul de cobalt se transformă în sulfura de cobalt de culoare neagră sau negru-brună.

Fosfataza alcalină se găsește atât în mediu cât și în citoplasmă; activitatea fosfatazei alcaline este foarte intensă în țesuturile cu multipli active ca: foliculi limfatici, măduva osoasă hematopoietică, etc.

III. Transferazele sunt enzime care transferă resturi de molecule de pe un donator pe un acceptor. Exemple de enzime din acest grup sunt: aminotransferazele (transaminaze) care catalizează transferul unei grupări amino de pe un cetoacid (acidul piruvic), glycozyltransferazele care transferă un rest glucidic de pe un donator pe un acceptor.

8.3. Metode biochimice

Cercetări la nivel molecular se fac și prin investigarea biochimică a enzimelor. Aceste cercetări de biologie moleculară a furnizat biologiei și medicinii posibilitatea de interpretare a mecanismelor fundamentale la nivel molecular a unor procese care se petrec la nivel celular, (reglare, corelația dintre sinteză și descompunere, utilizarea energiei, reacții de biosinteză).

8.3.1. Principiul de lucru.

După recoltare, omogenizare și centrifugare activitatea unei enzime poate fi măsurată prin determinarea transformării substratului pe unitate de timp. Determinarea se realizează prin :

- + măsurarea scăderii concentrației substratului
- + prin măsurarea creșterii concentrației produsului de reacție apărut.

Ca bază la măsurarea activității enzimatice este proporționalitatea dintre viteza de reacție și concentrația enzimei.

Exprimarea activității enzimatice se face în unități internaționale. O unitate internațională se definește ca micromoli (substrat transformat / minut/ 100 ml (mg)).

În mod obișnuit determinările enzimatice se fac în condiții optime de temperatură, pH, concentrația substratului, coenzime și ioni anorganici.

Măsurarea cantității de substrat ntransformat sau a produsului de reacție catalizată se face cu metode spectrofotométrice, colorimetrice, etc.

Determinarea spectrofotometrică este una din cele mai exacte și comode metode de determinare a activității enzimatice. Testul se bazează pe măsurarea scăderii sau creșterii densității optice datorită oxidării NADH sau NADPH și reducerii NAD și NADP. Citirile se fac la 340 nanometrii unde formele reduse NADH și NADPH au maximum de absorbție.

8.3.2. Determinarea gama glutamil transpeptidaze (gama GT)

Principiu. Gama G.T. catalizează transferul acidului glutamic de pe un donator - gama p-nitroanilidă - pe un acceptor - glicin - glicina. În urma reacției se formează p-nitroanilina colorată în galben.

Reactivi.

1. substrat sub formă de comprimate - 12,5 mg.

2. tampon Tris HCl - 0,2 M ; pH = 8,2

0,605 gr Tris | _____ 25 ml apă bidistilată

1,7 gr HCl | _____ 100 ml apă bidistilată

12,5 ml Tris; 0,2 M + 5,6 ml HCl; 0,2 M | _____ 50 ml apă

Mod de lucru.

Se încălzesc 9 ml tampon Tris HCl, pH = 8,2 la 40 - 50°C. Se adaugă substratul care trebuie să se dizolve în cel puțin un minut.

Testul de reacție.

În cuva de citire a fotometrului SPEKOL se pipează :

+ 1,5 ml soluția substrat în Tris HCl ;

+ se citesc T_0 ;

+ se adaugă 0,1 ml probă de analizat și se pornește cronometrul ;

+ se amestecă ;

+ se cibesc din minut în minut timp de 5 minute :

T_1, T_2, T_3, T_4 și T_5 ;

+ citirea se face la 405 nanometrii față de apă.

Calcul.

Se calculează valoarea medie a delta E/ minut.

$$\frac{T_5 - T_0}{5} = \text{delta E / minut}.$$

Delta E / minut / 1616 = gama G.T. U/L.

Valori normale

6 - 28 U/L la bărbați;

4 - 18 U/L la femei.

9. CULTURI DE CELULE

9.1. Introducere

Cultura de celule este o metodă larg utilizată, aducînd o importantă contribuție în biologie atât din punct de vedere practic cît și teoretic.

Prin cultură de celule se obține o multiplicare "in vitro" a celulelor provenite dintr-un fragment de țesut.

Această metodă permite:

I. - Studiul caracterelor morfologice și proprietățile biologice ale celulelor din diferite țesuturi, separate de organism și sustrase influenței sistemului nervos și a currentului sangvin. El se realizează prin :

- + examinarea celulelor în stare vie și în condiții normale cu ajutorul microscopului cu contrast de fază;
- + examinarea celulelor în stare vie dar supuse unui experiment (comportarea lor după acțiunea unor factori fizici sau chimici) în microscopia cu contrast de fază;
- + examinarea celulelor din culturi, fixate și colorate, cu ajutorul microscopului optic obișnuit.

II. - Studiul unor probleme de biologie tisulară ca de exemplu afinitatea sau antagonismul dintre suse tisulare diferite (paturile celulare ectoblastice și entoblastice nu se alătură fără interpoziție de mezoderm).

(III. - Culturile celulare oferă un excelent substrat pentru cultivarea pe scară largă a unei mari cantități de virusuri, dând astfel posibilitatea obținerii de antigene necesare preparării de vaccinuri.

9.2. Condiții materiale de lucru

Culturile de celule se prepară într-un spațiu amenajat special, care trebuie să ofere condiții optime de sterilitate. Aceste spații vor fi prevăzute cu instalații de apă curentă, gaze, electricitate.

Laboratorul de culturi celulare trebuie să fie dotat cu :

+ aparatură (pentru sterilizare, distilat și bidistilet apa, agitator magnetic, balanță analitică, termostat de 37° - 39° C, p.H- metru, microscop, etc);

+ instrumente fine (pense, foarfeci, bisturii);

+ sticlăria trebuie să fie neutră, perfect transparentă, fără neregularități; ea se împarte în recipiente speciale în care se fac culturile, precum și sticlăria obișnuită de laborator).

+ substanțe chimice cu utilități diverse (de exemplu substanțe pentru prepararea mediilor de cultură).

Reușita culturii celulelor "in vitro" depinde în mare măsură de pregătirea sticlăriei, spălarea și sterilizarea ei precum și de pregătirea instrumentarului care trebuie foarte corect făcută.

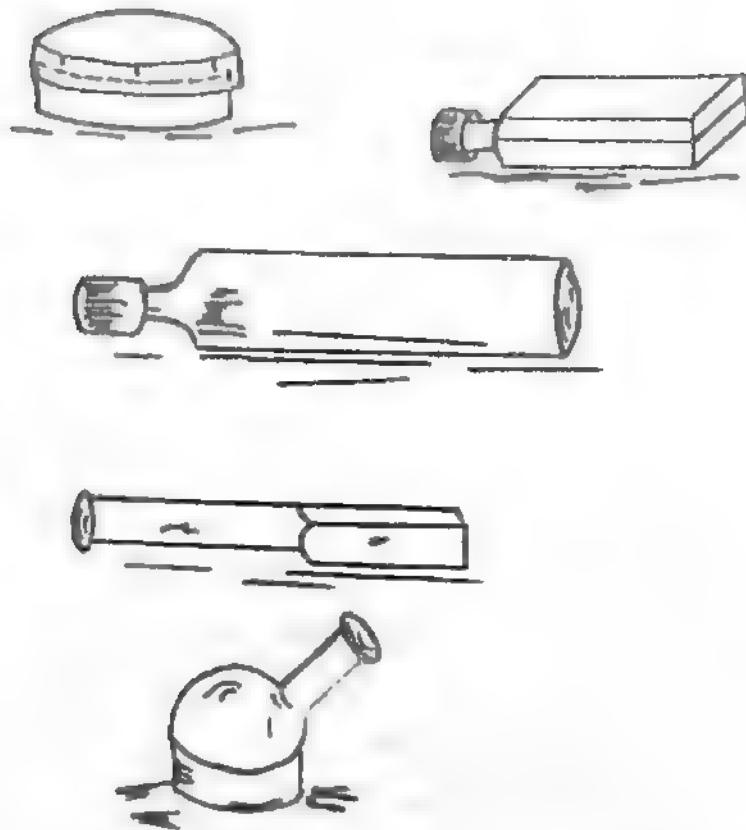


Fig. 8. - Diverse tipuri de vase de cultură

9.3. Mediile de cultură.

Oricare ar fi mediul folosit, el trebuie să asigure celulelor cultivate "in vitro" condiții apropriate de acelea pe care le oferă organismul viu. Deosebirile esențiale dintre aceste două modalități de viață și de multiplicare celulară sunt:

+ "in vivo", celulele sunt supuse controlului neuroendocrin și influenței țesuturilor și organelor din vecinătate; "in vitro" celulele scapă de acest control;

+ "in vivo", aportul de substanțe nutritive ca și eliminarea produselor de metabolism se face în mod continuu prin intermediul circulației sanguine și limfatice; "in vitro", aportul și eliminarea sînt perioadice.

Mediile de cultură celulară trebuie să asigure :

+ echilibrul ionic obținut cu ajutorul soluțiilor izotone;

+ factorii nutritivi : aminoacizi esențiali, proteine animale (lichide biologice ca plasmă, ser sanguin, lichid amniotic, etc), glucide, vitamine, derivați de acizi nucleici;

+ un pH optim, constant în timp mai îndelungat, obținut cu ajutorul unor substanțe lipsite de citotoxicitate;

+ evitarea contaminării cu germeni patogeni prin adăugarea de antibiotice (penicilină, streptomicină) și antifungice (micostatin, stamicin).

+ stimularea multiplicării și cresterii celulelor prin adăugarea de extracte embrionare.

Mediile de cultură se clasifică după următoarele criterii:

1. după consistență - lichide
 - semisolide
2. după compoziție - naturale
 - semisintetice
 - sintetice

*o mioră
mioră*

3. după scopul urmărit

- de creștere (extracție embrionare)
- de întreținere

9.4. Clasificarea culturilor

Se cunosc două mari grupe de culturi:

A. Cultura de organ sau organucultura, înseamnă scoaterea din organism a unui segment de organ (fragment de intestin, trahee) sau organ (rinichi) și introducerea sau perfuzarea lor cu un mediu nutritiv: ele se mențin "in vitro" un timp limitat (transplant).

B. Cultura de celule prin care se obține o multiplicare celulară "in vitro"; există două tipuri de astfel de culturi:

a/ cultura de țesuturi obținută din fragmente de țesut puse în condiții de mediu corespunzătoare: ea are proprietatea de a forma în jurul fragmentului care se numește explant, o coroană de celule fine, în multiplicare, celule care pot fi de tip conjunctiv (fibroblastic) sau de tip epitelial.

(b) cultura celulară propriu-zisă obținută prin cultivarea într-un mediu nutritiv a unei suspensii de celule provenite din dilacerarea unui țesut realizată prin tratamentul enzimatic sau chimic.

După criterii tehnologice, culturile celulare se clasifică în:

~~+~~ cultura în monostrat în care celulele sunt capabile de multiplicare pe un suport solid, neted;

(+) culturi în suspensie realizate într-un mediu de cultură corespunzător.

9.5. Tehnica culturii celulare

Toate etapele tehnicii culturii celulare trebuie să respecte cu rigurozitate regulile de asepsie.

9.5.1. Recoltarea se poate face din cele mai variate țesuturi provenite de la om, animal sau plante.

După proveniența lor, țesuturile care urmează anfi cultivate se împart în :

a/ tesuturi normale - embrionare
- adulte

b/ tesuturi tumorale -

Recoltarea trebuie să îndeplinească următoarele condiții :

+ să evite contaminarea țesutului cu microorganisme;

+ să evite traumatizarea ei atât în timpul recoltării cât și în cursul manevrelor ulterioare;

+ de la recoltare și pînă în momentul preparării culturii, țesutul va fi păstrat la rece (la + 4°C) într-o soluție salină în care am adăugat antibiotice; timpul scurs de la recoltare și pînă la efectuarea culturii nu trebuie să depășească 3-4 ore.

9.5.2. Tehnica culturii cu fragmente de țesut direct pe sticlă folosește cu precădere țesuturi embrionare.

Se preferă recoltarea de la embrioni de 1 - 3 luni obținuți prin întreruperi de sarcină. După extragere, embrionul este depus într-un cristalizator steril, cu capac, care conține o soluție salină cu antibiotice.

Astfel ambalați, embrionii sau fragmentele de embrion trebuie să ajungă în cel mai scurt timp la laborator. Aici, cu ajutorul unor pense sterile se aleg fragmente de țesut embrionar îndepărțindu-se cu atenție chiagurile de singe; fragmentele curate se trec într-o altă cutie Petri sterilă care conține deasemeni soluție salină.

Operația de transvazare a fragmentelor se repetă de 2-3 ori dar de fiecare dată trebuie folosite alte instrumente sterile; prin aceste transvazări sucesive se elimină chiagurile de singe și porțiunile de țesut neutilitabile (strivite).

După ultima spălare, fragmentele se pun într-o eprubetă de centrifugă sterilă și cu ajutorul unor foarfeci sterili și bine ascuțite se caută să se obțină o masă de aspect omogen.

Tegumentul embrionului trebuie considerat contaminat; sterilizarea lui se face cu alcool iodat, având grijă ca antisepticul să nu pătrundă în cavitățile embrionului după incizarea lui.

Cu ajutorul unei pipete Pasteur sau a unei anse sterile se ia o cantitate din suspensia de țesut embrionar care se întinde apoi pe una din suprafețele unui recipient de cultură steril (flacon de tip Kolls, Roux, etc); repartizarea suspensiei trebuie să fie cât mai uniformă.

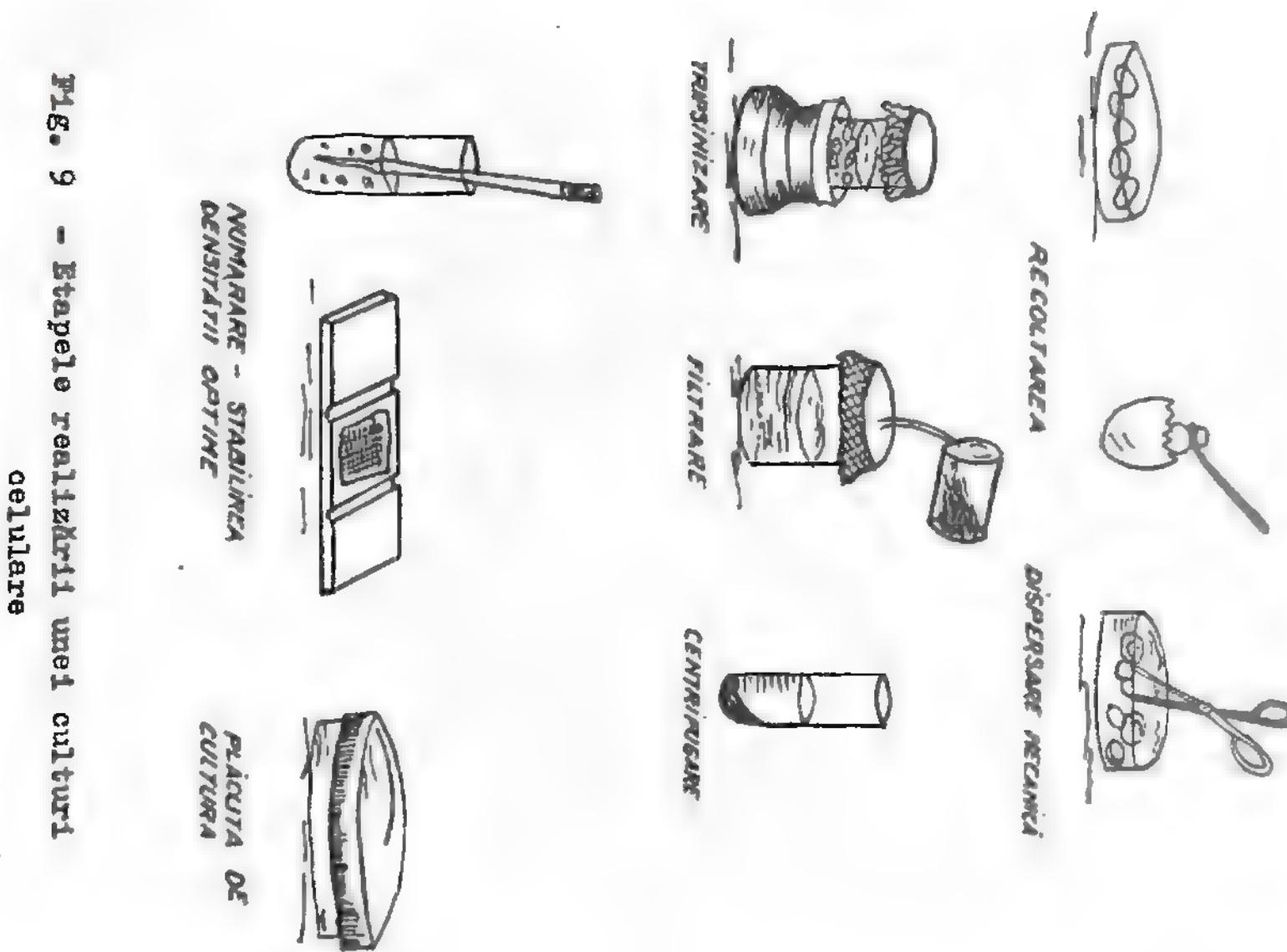


Fig. 9 - Etapele realizării unei culturi celulare

Recipientul, cu față pe care este întinsă suspensie situată în jos se lasă la temperatura camerei sau la termostatul de 37°C timp de 30 - 60 minute. După trecerea acestui timp se introduce mediul nutritiv, având grijă ca el să nu antreneze fragmentele de pe sticlă.

Recipientele sunt astupate cu dop de cauciuc și incubate într-un termostat la 37°C . În timpul incubării, recipientele nu trebuie mișcate din loc cel puțin 3-4 zile.

9.5.3. Controlul celulelor cultivate trebuie făcut înaintea oricărui experiment. Se face :

A. Controlul mediilor

+ control pentru conta mănti (bacterieni, fungi, micoplasmatici și virusuri);

+ controale ale constantelor fizico-chimice (pH, proteine totale, etc);

+ controalele de eficiență sunt diferite, în raport cu ingredientul cercetat (soluții izotone tamponate, medii de creștere, etc); se face aprecierea densității celulare pe suprafața suportului, evaluarea eficienței de formare a coloniilor celulare, etc.

(B) Controlul morfologic urmărește aspectul morfologic al celulelor din cultură. El se realizează prin :

1. Tehnici de microscopie optică :

+ examinarea celulelor în stare vie la microscopul cu contrast de fază (aprecierea formei celulelor,

gradul de granularitate a citoplasmei, conturul nucleului, etc.).

+ examinarea preparatelor fixate și colorate.

2. Tehnica de histoautoradiografie

3. Tehnici de microscopie electronică.

10. FRACTIONAREA CELULARĂ

10.1. Introducere

In biologia celulară cît și în alte domenii de cercetare (biochimie, genetică, etc), studiul diverselor componente celulare (organite, macromolecule) obținute prin metoda ultracentrifugării diferențiate are o mare valoare științifică.

Obținerea separată a organitelor (nuclei, mitocondrii, lizozomi, ribozomi, membrane, etc) sau a unor macromolecule A.D.N.e, A.R.N.e, se realizează cu ajutorul ultracentrifugării diferențiate a celulelor. Aceasta trebuie să țină cont ca :

- + pentru o anumită structură biologică trebuie aleasă o soluție tampon cu o osmolaritate și cu un pH corespunzător;
- + toate operațiunile trebuie să se desfășoare la o temperatură de $0^{\circ} - + 4^{\circ}\text{C}$;
- + înaintea fractionării prin ultracentrifugare, soluțiile tampon și rotoarele ultracentrifugii trebuie răcite;
- + trebuie ales rotorul corespunzător care să asigure turăția optimă în vederea obținerii fractiunii celulare dorite;
- + ultracentrifugarea trebuie făcută în ultracentrifugi cu răcire.

Pentru obținerea fractiunilor celulare trebuie

să se țină seama de forța de sedimentare (g) care este un multiplu al accelerării gravitaționale și care se calculează după formula :

$$g = 0,00001118 \times r \times n^2$$

(r) = raza rotorului exprimată în centimetri, măsurată de la fundul tubului la axul rotorului ;

n = numărul de rotații pe minut.

Convertirea turățiilor în G-uri se face cu ajutorul nomogramei. Nomograma este un instrument matematic în care sunt puse în relație cun număr de variabile.

Relația între variabile se stabilește cu un purtător de puncte care este o linie dreaptă. Cunoscind două din mărimi - raza și forța centrifugă (g) - cu purtătorul de puncte putem afla pe a treia variabilă, numărul de turății pe minut.

Redăm mai jos un tabel orientativ privind separarea unor componente celulare la diferite valori ale forței de sedimentare.

=====
Denumirea particu- Forța de sedimentare

lelor (g)
=====

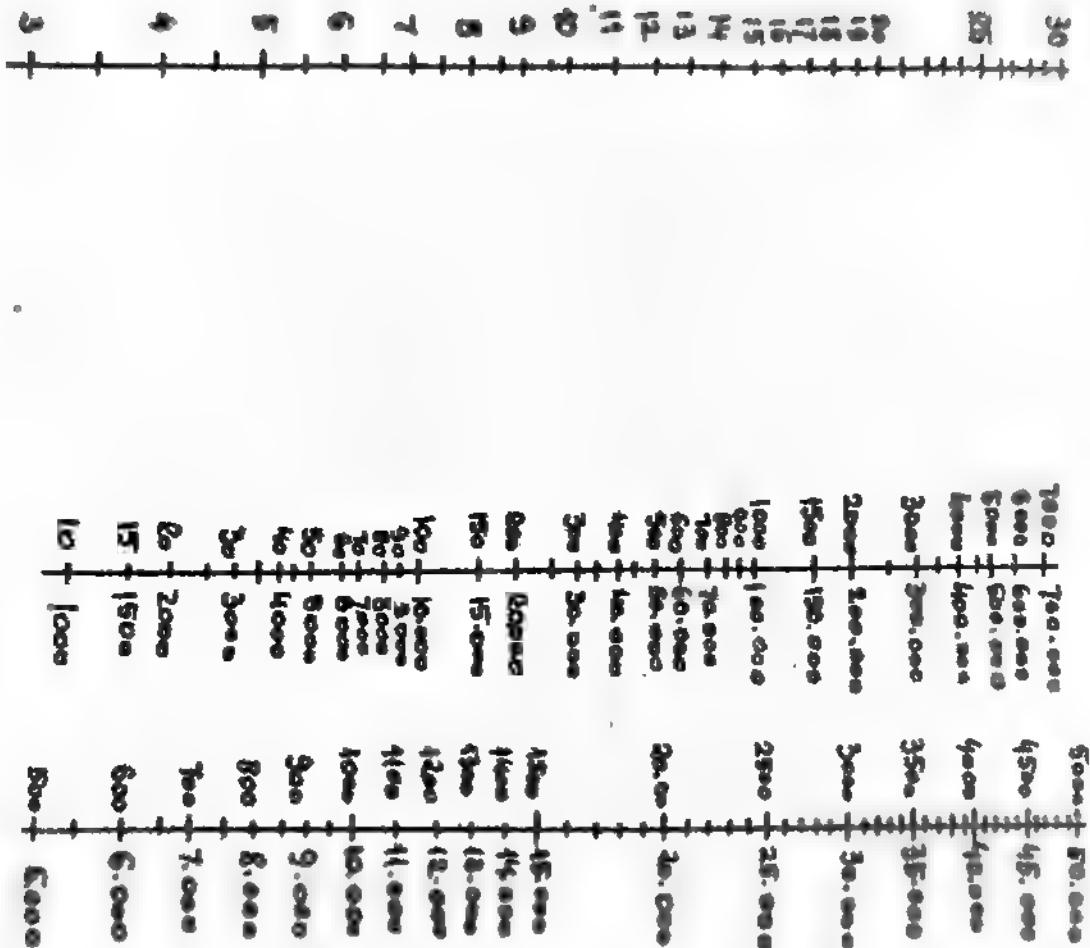
Nuclei 300 - 1000

Mitocondrii 8000-13000

Microzomi 70 000 - 150. 000

Acizi nucleici (

n (cm) G (t/min) U (t/min)



NO M O G R A M A G

$$G = 4,111 \cdot 10^{-5} n \cdot U$$

10.2. Omogenizarea țesuturilor

Omogenizarea țesuturilor animale sau vegetale duce la formarea unui omogenat realizat prin distrugerea structurii tisulare și ruperea membranelor celulare.

Omogenatul trebuie să păstreze localizarea particulelor subcelulare și să conserve structura chimică a substanelor.

Recoltarea țesutului de prelucrat trebuie făcută într-un timp cât mai scurt și la o temperatură de + 4°C care se va menține constantă în toată perioada fractionării.

Ruperea membranelor celulare se realizează prin trei metode :

- + prin soc osmotic obținut prin îngheț-dezgheț;
- + prin omogenizare mecanică ;
- + prin ultrasunete.

Cel mai utilizat procedeu este omogenizarea mecanică care se realizează zdrobirea țesutului cu ajutorul omogenizatoarelor coaxiale de tip POTTER. Timpul de omogenizare variază în funcție de organ, de la 1 la 5 minute.

10.2.1. Tehnica omogenizării. Pentru omogenizare se pot utiliza aproape toate țesuturile și organele ca mușchi, creier, rinichi, tiroidă, etc.

Mediile în care se face omogenizarea precum și sticlaria pentru luor se păstrează la rece (+ 4°C).

Fragmentul de țesut sau organ prelevat imediat după sacrificarea animalului de experiență de pe care se îndepărtează fasciculele conjunctive și straturile adipoase, se spală de cîteva ori în ser fiziologic rece; cu ajutorul unui foarfec ascuțit se caută să se obțină fragmente cît mai mici.

Un gram din fragmentele astfel obținute se transvazează în eprubeta omogenizatorului (care trebuie să aibă peretii suficient de groși) în care se află o soluție de sucroză 0,3 M sau de zaharoză 0,25 M. Cu ajutorul omogenizatorului coaxial se face omogenizarea timp de 2-5 minute și la o turătie de 1500 - 3000 ture pe minut. (Fig.10).

Pentru determinări enzimatiche, omogenatul obținut se centrifughează timp de 5-10 minute la 700 g.; sedimentul va conține celule întregi, nuclei și resturi celulare.

Interpretarea corectă a rezultatelor determinărilor biochimice făcute pe omogenat necesită standardizarea materialului. Ea se face prin :

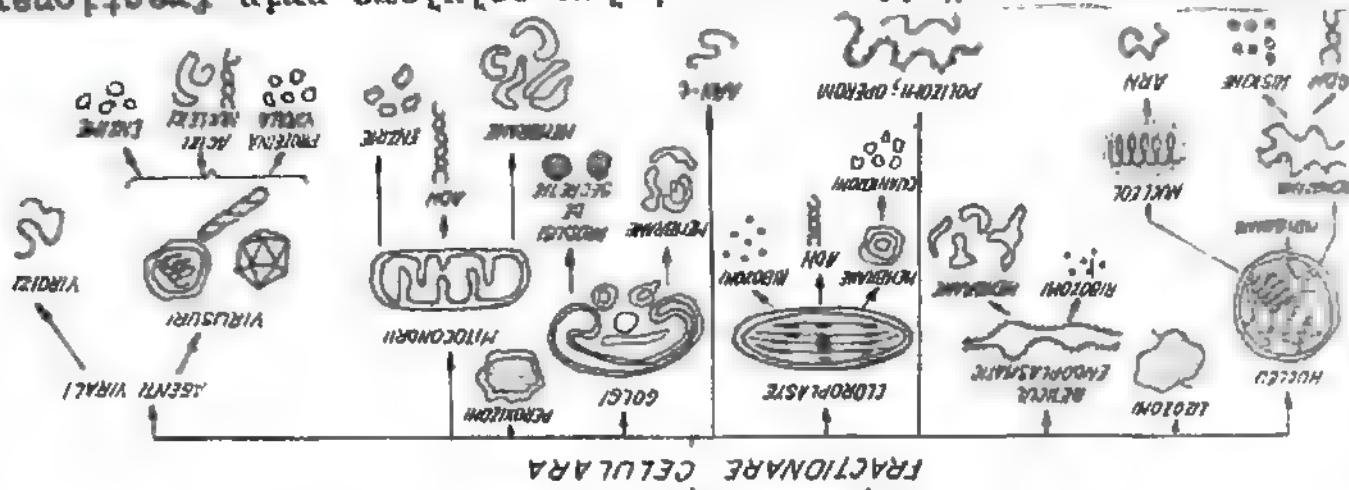
+ raportarea la greutatea produsului de plecare sau standard de preparare;

+ raportarea la conținutul proteic al omogenatului

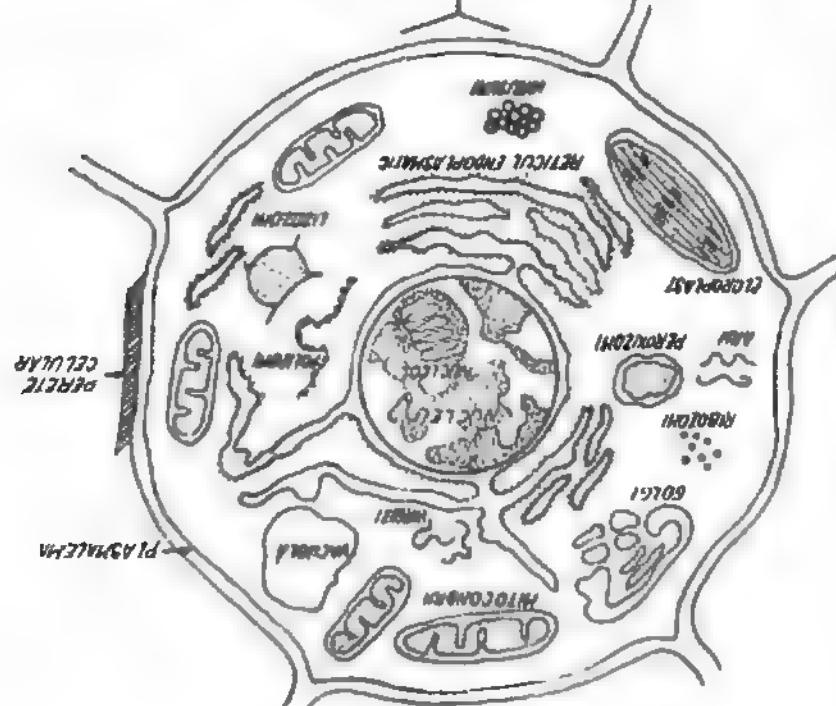
lc.2.2. Ultracentrifugarea diferențială reprezintă cea mai simplă metodă cu ajutorul căreia, din omogenat se separă un supernatant în care se găsesc particule cu greutate moleculară mai mică și un sediment unde se află particule cu greutate moleculară mai mare.

celulär.

FIG. 10. Schéma des principaux composants de la cellule végétale primaire



PRINCIPAUX COMPOSANTS DE LA CELLULE VÉGÉTALE



După o primă ultracentrifugare, atât supernatantul cît și sedimentul pot fi supuse la alte fractionări.

10.2.2.1. Nucleii celulelor animale se obțin după următoarea tehnică: țesutul se omogenizează și se centrifughează apoi timp de 10 minute la 1 000 g. Supernatantul se îndepărtează iar sedimentul se suspendă într-o soluție care cuprinde 200 ml soluție de omogenizare și 1,26 ml n - octil - alcool, omogenizîndu-se din nou; se centrifughează timp de 10 minute la 1000 g obținîndu-se un sediment care conține nuclei într-un procent ridicat. Supernatantul se îndepărtează.

Sedimentul astfel obținut se mai centrifughează încă de două ori a 10 minute și la 1 000 g, schimbînd de fiecare dată mediul de omogenizare în care nu se mai adaugă n - octil - alcool. După ultima centrifugare sedimentul este format numai din nuclei.

10.2.2.2. Mitocondriile se obțin în felul următor: se omogenizează fragmente de cord în tampon Tris - HCl (pH = 7,6) cu sucroză 0,25 M (10 gr fragmente cord la 100 ml lichid de omogenizare); produsul obținut se filtrează prin tifon iar filtratul se centrifughează la 800 gr timp de 10 minute.

Supernatantul obținut se centrifughează la 6 000 g timp de 15 minute iar sedimentul se resuspendă în amestecul sucroză 0,4 M cu E.D.T.A. 0,01 M la pH = 7,6.

Se ultracentrifughează timp de 20 minute la 15 000 g iar sedimentul se dizolvă în tampon Tris-HCl cu pH = 7,6 în care se adaugă sucrăză 0,25 M. Sedimentul conține foarte multe mitocondrii.

lo.2.2.3. Lizozomii. La șobolanii de experiență se injectează timp de 10 zile o soluție de fier; în a doua zi după ultima injectare se recoltează parenchim hepatic care se omogenizează în sucrăză 0,3 M. Se ultracentrifughează la 100.000 g iar în sedimentul obținut se găsesc mulți lizozomi.

lo.2.2.4. Ribozomii. Se obțin după o centrifugare de 18 ore la 105 000 g.

lo.2.2.5. Cromatina. (Sedimentul cu nuclei obținut prin tehnica descrisă la capitolul lo.2.1. suspendat în soluție tampon, se ultracentrifughează de trei ori la 12 000 g, 54 000 g și 120 000 g. Sedimentul obținut după a treia centrifugare conține cromatina pură.

lo.3. Studiul fractiunilor celulare

Toate structurile celulare obținute prin tehnica ultracentrifugării diferențiale pot fi studiate atât din punct de vedere morfologic cu ajutorul microscopului electronic, cât și din punct de vedere biochimic.

1.1.3.1. Studiul fracțiunilor celulare

celulare este posibilă datorită tehniciilor de prelu-
carea materialelor biologice pentru microscopia elec-
tronică precum și tehniciilor de colorare negativă.

Colorarea negativă. Metoda "colorării" negative folosită și în studiul fracțiunilor celulare, constă în depunerea unui preparat biologic transparent la fluzul de electroni pe un pat "colorant", dens electronomicroscopic și apoi examinarea lui la microscopul electronic. Preparatul rămâne transparent iar fundul întunecat.

De exemplu, cromatina obținută prin ultracentrifugarea diferențială a nucleilor se poate studia la microscopul electronic depunând sedimentul pe grilă și "colorindu-l" negativ. Ea va apărea sub forma unui lanț flexibil de particule sferice (nucleozomi) legate prin molecule de A.D.N.

Există mai multe metode de colorare negativă, una din ele fiind colorarea directă. Tehnica este următoarea: cu ajutorul unei micropipete se amestecă în părți egale preparatul biologic suspendat într-un tampon volatil (acetat, carbonat, etc... de amoniu) cu soluția de "colorant" (acid fosfotungstic, acetat de uranil, etc... în apă distilată) ; o picătură din amestecul rezultat se depune pe o grilă (preferabil de 400 mesh și cu peliculă de cărbune) și se lasă 15-20 secunde după care, excesul de lichid se îndepărtează cu hirtie de filtru prin atingerea marginii grilei.

Cu ajutorul acestor metode se pot evidenția fractiunile electroforetice ale acizilor nucleici, separarea și identificarea acizilor aminoți prin cromatografie, activități enzimaticice, etc.

10.3.2. Studiiul biochimic se realizează în special cu ajutorul metodelor fizico-chimice de analiză. Acestea se clasifică în :

- + metode optice (colorimetrică, spectrofotometrică, etc.);
- + metode electrochimice (electroforeze);
- + radiochimice;
- + cromatografice.

25.04. '89

II. CELULA

(Organizare generală, formă, dimensiuni, număr,
învelișul celular)

II.1. Introducere

Celula reprezintă unitatea morfologică și funcțională a lumii vii, ea fiind alcătuită din:

I. - Invelișul celular care separă mediul intracellular de cel extracellular;

II. - Protoplasma, la nivelul căreia se desfășoară principalele reacții chimice (biosinteza proteică, fosforilarea oxidativă, etc.); ea formează :

1.- nucleul ;

2.- citoplasma.

La rîndul său, citoplasma se prezintă sub două aspecte :

a.- citoplasma nestructurată sau hialoplasma (substanța fundamentală a citoplasmei);

b.- citoplasma structurată sau morfoplasma, care formează organitele celulare cu rol în îndeplinirea unor anumite funcții; acestea sunt : reticulul endoplasmatic neted și rugos, ribozomii sau corpusculii lui Palade, mitocondriile, lizozomii, peroxizomii, complexul Golgi, centrul celular sau centrozomul, microtubii și microfilamentele.

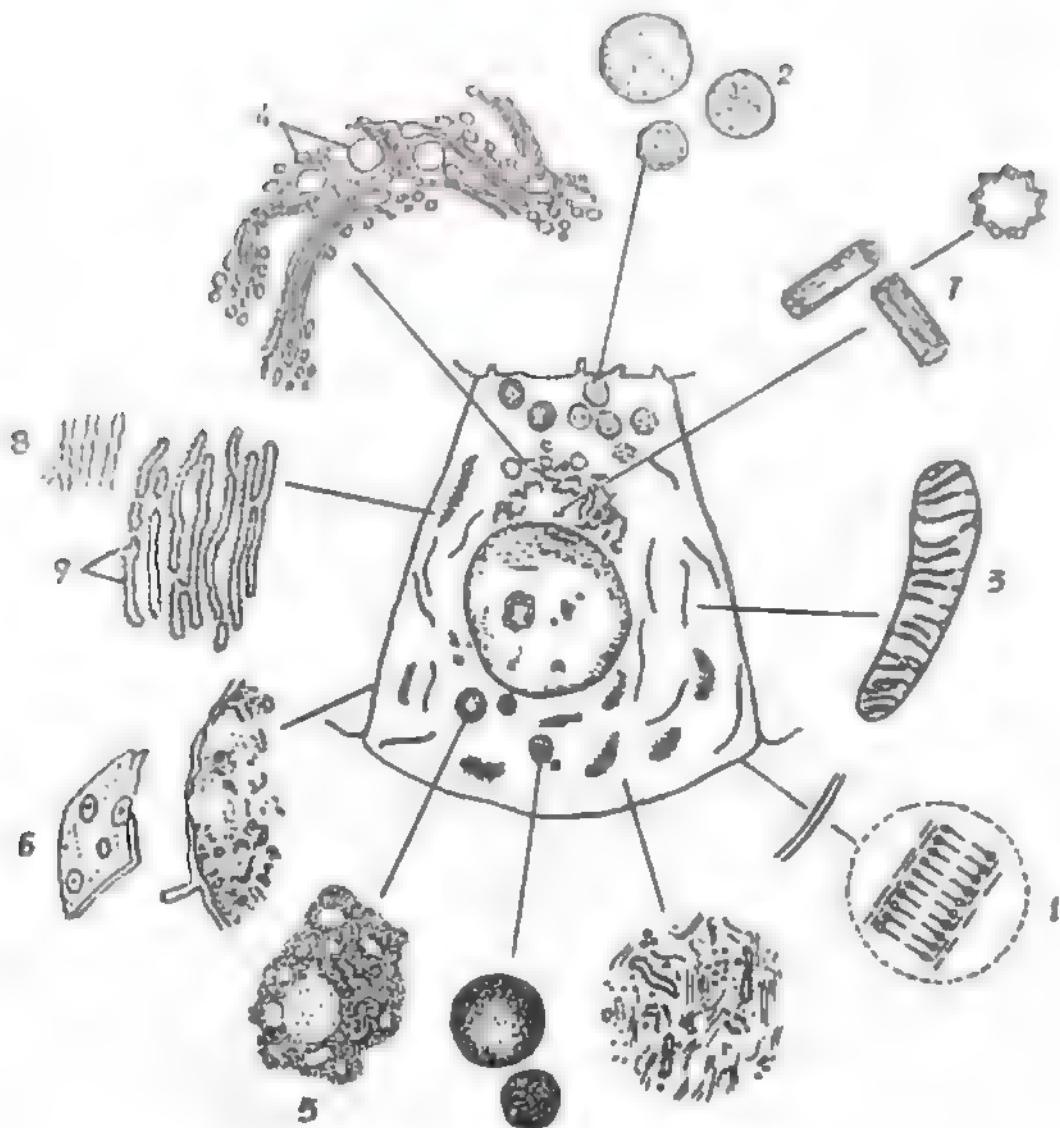


Fig. 11. Reprezentarea schematică în M.O. și M.E. a unei celule.

- 1. Plasmalema; 2. Granule de secreție;
- 3. Mitochondrii; 4. Complex Golgi; 5. Nucleol;
- 6. Cromatină și înveliș nuclear; 7. Diplosom;
- 8. Reticul endoplasmatic nested (R.E.N.);
- 9. Reticul endoplasmatic rugos (R.E.R.).

În afara organitelor celulare, în citoplasmă se pot găsi incluziunile celulare, care reprezintă substanțe de rezervă (picături de grăsime, granule de glicogen), produse de secreție (pigmenți), acumulări de produse exogeni (particule de cărbune, siliciu).

II.2. Forma celulelor

Forma celulelor este foarte variată datorită funcțiilor și raporturilor diferite dintre ele precum și caracterelor fizico-chimice ale mediului în care își desfășoară activitatea. ↪

Intr-un organism pluricelular există :

1.- Celule cu forme schimbătoare, care fac parte din grupul celulelor care își desfășoară activitatea într-un mediu lichid (celulele sanguine). În mod obișnuit aceste celule au o formă sferică sau ovalară. Părăsind vasul și trecând în țesuturi, leucocitele polimorfonucleare sau granulocitele (în special cele neutrofile) își modifică formă căpătind un contur neregulat prin emiterea pseudopodelor.

Un alt exemplu îl constituie epitelul mucoasei și vezicii urinare care se aplatizează în momentul în care ea se destinde prin acumulare de urină.

2. - Celule cu forme fixe, reprezintă marea majoritate a celulelor dintr-un organism pluricelular. Forma lor variază în funcție de natura celulelor, a funcțiilor specifice și a influențelor mecanice exercitate de elementele vecine. Se întâlnesc :

11.3. Dimensiunile celulelor

Talia celulelor variază de la un tip celular la altul. În organismul uman, cele mai mici celule sunt cele din stratul granular al scoarței cerebeloase ale căror diametru este cuprins între 3 - 4 microni.

Cele mai frecvente dimensiuni sunt cuprinse între 35 - 40 microni (celule primatice ale epiteliumului intestinal).

Neuroni din stratul piramidal al scoarței cerebrale măsoară aproximativ 10 microni.

Ovulul, ceea mai mare celulă din organismul uman poate fi văzută cu ochiul liber ajungând la dimensiuni

a/. - celule nisipoice (ovulul, celula grasă sau adipocitul, granulocitele din torrentul circulator);

b/. - celulele poliedrice, cubice și prismatice intră în alcătuirea țesutului epitelial din epitelii stratificate, de acoperire, canale exterioare a glandelor salivare, epitelial mucoselor gastrice și intestinale);

c/. - celulele pavimentcase sau parte la formarea seroselor (pleură, pericard seros), endotelul vascular, epitelii foliei parietale a capsulei lui Bowman (corpusculul renal - Malpighi);

d/. - celulele fusiforme au partea centrală mai îngroșată iar cele două capete epilate (celula musculară netedă) ;

e/. - celule cu prelungiri (celula nervoasă, osteocitul).

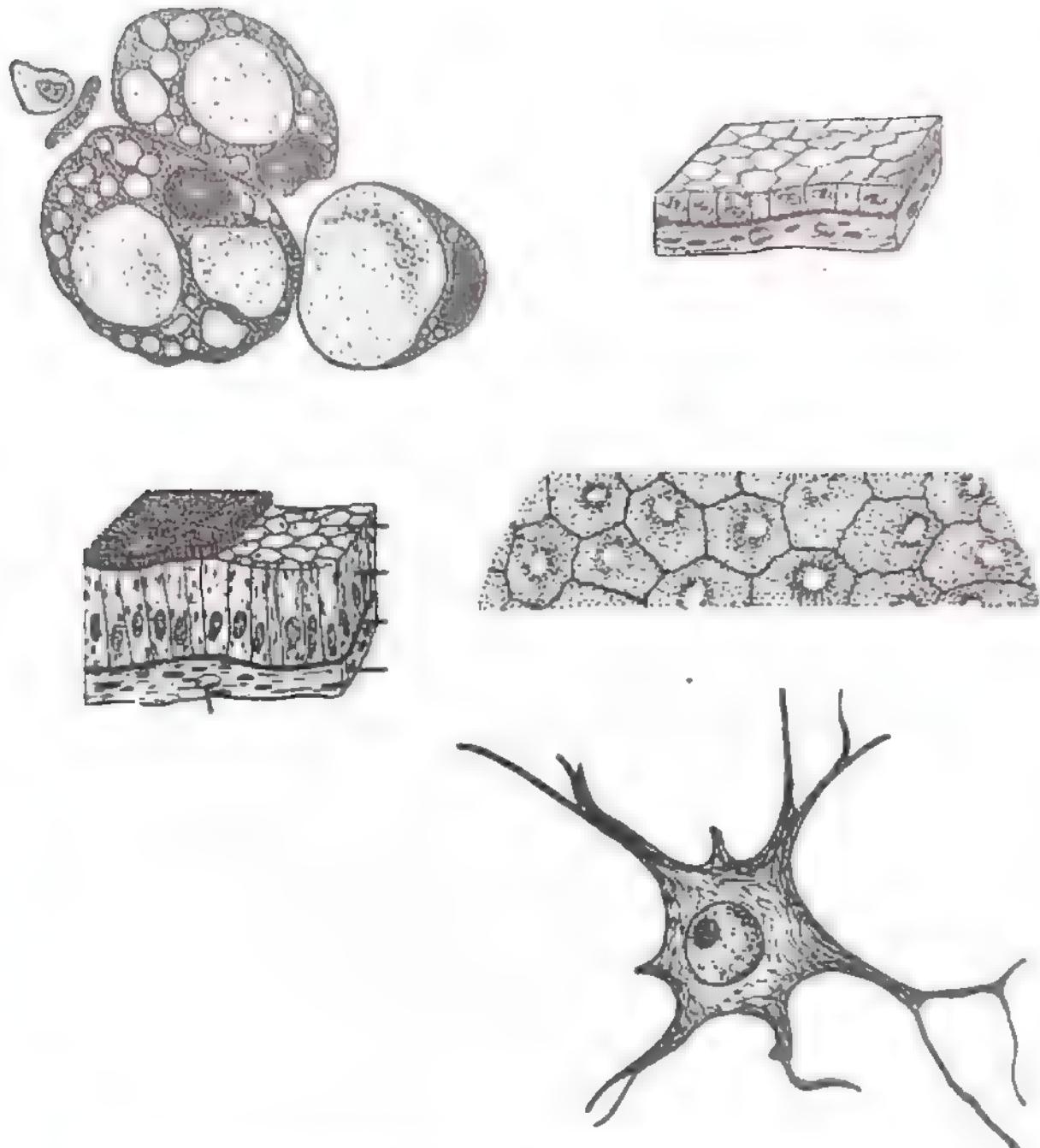


Fig. 12. Diferite tipuri de forme celulare:
 a/adipocit; b/epiteliu cubic l;
 c/epiteliu prismatoc; d/mezoteliu ;
 e/miocite netede; f/neuroni.

de 150 - 200 microni. Volumul celular variază între 250 - 15 000 microni³.

În general talia și volumul sunt constante pentru același tip celular. În anumite situații ca de pildă intensificarea proceselor metabolice care au drept consecință schimbarea raportului nucleo-plasmatic, talia și volumul celulei se modifică.

11.4. Numărul celulelor

Este variabil în raport de specie și în general același la indivizi din aceeași specie. Un organism adult are aproximativ 200 miliarde de celule.

11.5. Invelișul celular

Invelișul sau periferia celulară este partea din celulă care separă mediul intracelular de cel extracelular.

În microscopia electronică, periferia celulară apare ca o structură foarte complexă căreia Bennett (1962) îi distinge două componente:

1.- plasmalema sau membrana celulară care vine în raport direct cu mediul intern al celulei;

2.- glicocalixul situat pe partea externă a plasmalemei și care vine în contact cu mediul extracelular.

(11.5.1. Plasmalema)

Microscopia optică nu poate oferi detalii de structură, deoarece membrana celulară are o grosime

foarte mică ($0,1 - 0,2$ microni) iar puterea de mărire și de rezoluție a microscopelor este relativ redusă.

Pe preparatele examineate la microscopul electronic se apare cu o structură trilamelată, suprafața ei externă fiind acoperită de un fin strat granular sau filamentos, glicocalixul ; are o grosime de $75 - 200$ Å.

În alcătuirea ei intră două straturi osmiofile, dense la fluxul de electroni, între care se găsește al treilea strat, osmiofob, puțin dens electronomicropic.

Straturile osmiofile sunt formate din molecule proteice iar stratul osmiofob este alcătuit din molecule de glicofosfolipide (fig.13.).

Membrana celulară este o membrană biologic activă, care pe lîngă funcția de frontieră dintre cele două medii: intracelular și extracelular, reprezintă și o barieră cu permisiabilitatea variabilă pentru diverse substanțe. Datorită acestei calități, prin plasmalemă se realizează :

- a/ transportul substantelor în ambele sensuri
- b/ transportul de informații (hormonii care impun celulei să întărească o modificare în activitatea sa.).

(11.5.2. Glicocalixul)

Glicocalixul este o pătură glicolipoproteică situată la suprafața membranei plasmatici, de a cărei integritate depinde activitatea fiziologicală a celulei.

Datorită conținutului bogat în mucopolizaharide,

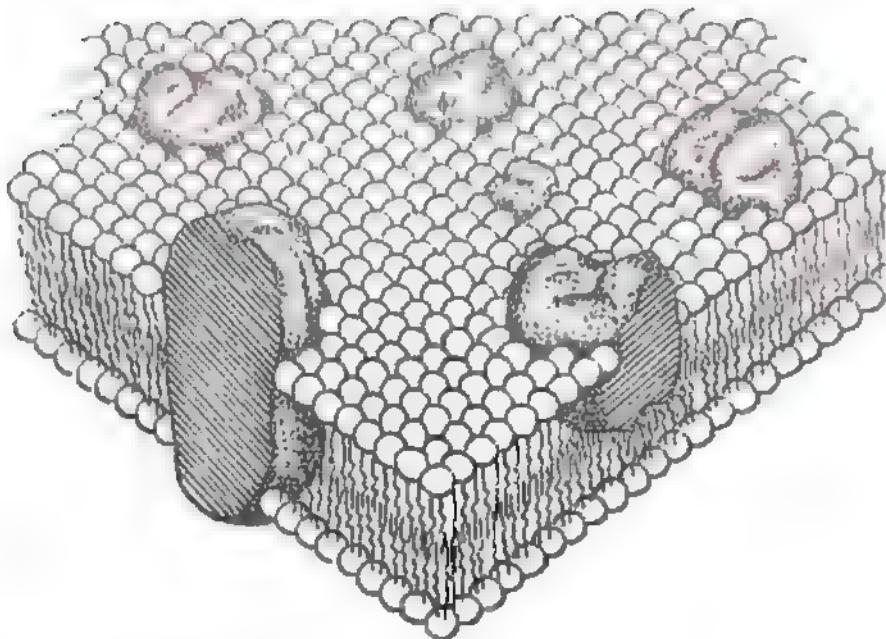


Fig. 13. Modelul în mozaic a lui Singer și Nicolson
 1. dubla pătură lipidică ; 2. proteine globulare;

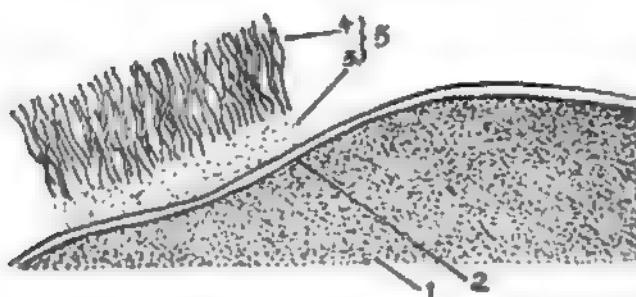


Fig. 14. Membrana plasmatică și glicocalixul.

1. mediul intracelular; 2. membrana plasmatică;
 3. zona amorfă ; 4. zona externă;5. glicocalix.

glicocalixul poate fi observat și în microscopia optică prin folosirea tehnicilor histo chimice de evidențiere a acestor substanțe (reacția P.A.S., fier coloidal, etc.), (fig. 14.).

În microscopul electronic glicocalixul se prezintă sub forma unui material fibrilar. Filamentele sale fine de ordinul angstromilor se întrelapă formând o rețea; ele se dispun perpendicular pe plasmalemă de către feță externă aderă.

Glicocalixul este mai dezvoltat la polul apical al enterocitelor, nefrocitelor, etc. Este mai slab reprezentat la locul de contact al celulelor.

11.6. Specializările membranăi celulare

Specializarea este o diferențiere structurală sau o transformare morfologică complexă care conferă celulei o anumită funcție; se clasifică în: permanente și temporare. Cele permanente se găsesc la nivelul:

- la nivelul plasmalemei polului apical;
- " " plasmalemei polului bazal;
- " " contactului plasmalemelor a două celule vecine.

11.6.1. Specializările plasmalemei apicale.

Reprezintă diferențieri ale membranei și cito-plasmalemei superficiale asigurând celulei o funcție precisă (exemplu - funcție rezorbțivă).

Ele sunt reprezentate prin :

1. microvilozițăți, izolate sau foarte numeroase (platou striat, marginea în perie, stereocili).

2. cilii vibratili și flagelii.

1.- Microvilozițăile sunt expansiuni citoplasmaticice cilindrice limitate de plasmalemă apicală care se întâlnesc la polul apical al enterocitelor (platou striat), al nefrocitelor (margine în perie) etc. Ele intervin în special în fenomenele de absorbție mărind suprafața acestora. (fig. 15).

a.- În microscopia optică platoul striat apare sub forma unei zone cu striații perpendiculare pe suprafața plasmalemei.

În microscopia electronică, această zonă este alcătuită din numeroase microvilozițăți, fiecare din ele având o lungime de 0,6 - 0,8 microni și un diametru de 80 - 100 milimicroni.

Microviliii sunt limitați la periferie de membrana plasmatică trilamelată. Citoplasma lor prezintă o zonă periferică de 200 - 300 μ grosime, lipsită de structură și o zonă centrală care conține 10 - 15 microfilamente.

b.- Marginea în perie are microvili de dimensiuni inegale.

c.- Stereociliile sunt expansiuni citoplasmaticice imobile a căror formă și structură se asemănă cu cea a microviliilor. Se aglomerează mai mulți la un loc și formează un fel de tufe ghidind direcția de evacuare a produșilor de secreție. Microfilamentele miezului sunt dispuse neregulat.

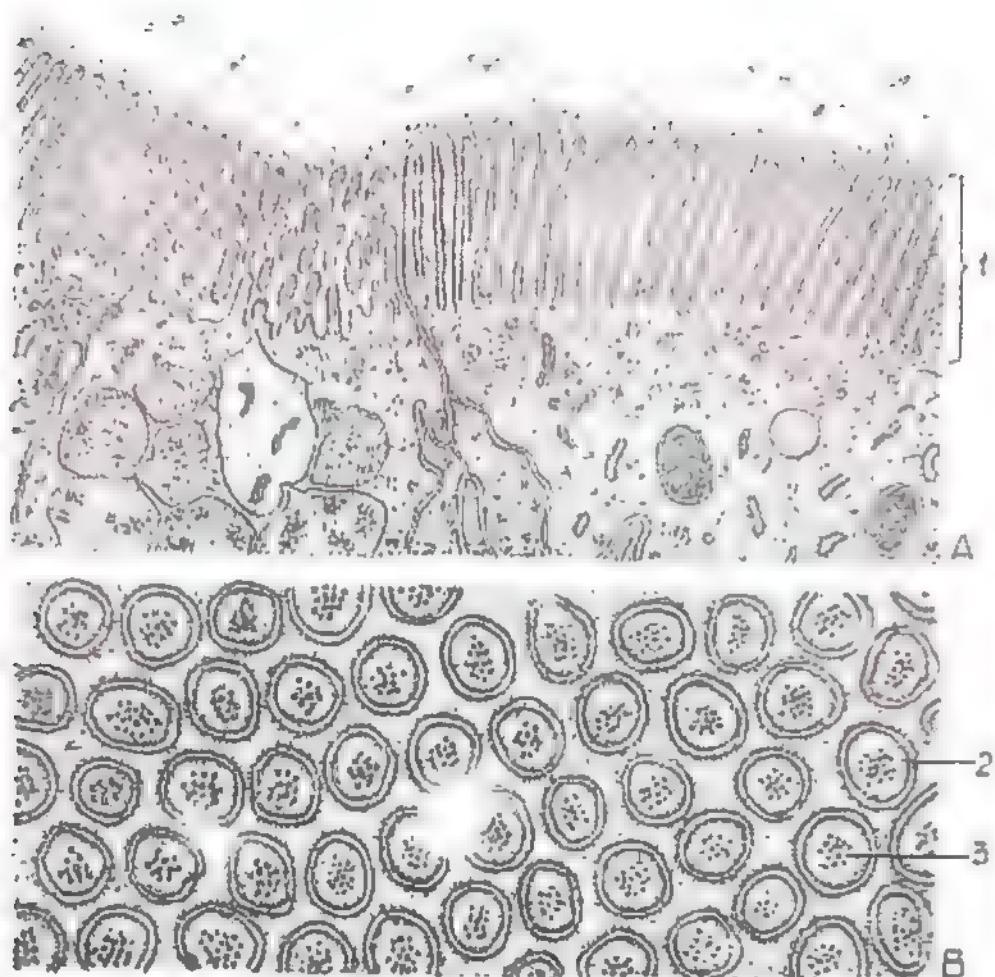


Fig. 15. Microviliozitate.

A/ Secțiune longitudinală ;

B/ Secțiune transversală

1. microtubi
2. plasmalemă
3. microfilamente

Stereociliile se găsesc la polul apical al celulelor epiteliale din epidididin și canalele deferente, la celulele de susținere ale epitelialui olfactiv, etc.

(2.- Cilii vibratili sunt expansiuni citoplasmatice mobile delimitate de plasmalemă, care prezintă mișcări pendulare sau ondulatorii. Se găsesc la polul apical al epiteliului căilor aeriene superioare, trompă uterină, etc. Au o lungime de 5-10 microni și grosimea de 0,5 microni cu excepția cozii spermatozoidului.

Ei se compun din :

- + - o tijă ;
- + - o zonă de tranziție;
- + - un corpuscul bazal sau centru cinetic;

- Tija cilului are forma unui vîrf de flacără de luminare și delimitat la periferie de membrana celulară trilamelată. Citeplasma se diferențiază în două zone;

- + la periferie o matrice puțin densă la fluxul de electroni ;
- + la centru, complexul filamentos axial format din 10 perechi de microtubi dispuși în două grupuri;
- + o pereche de microtubi centrali de 200 Å;
- + 9 perechi de microtubi periferici.

- Zona de tranziție este situată între tijă și corpusculul bazal.

- Corpusculul bazal are o lungime de 5 000 Å și o lărgime de 1 200 - 1 500 Å. Are o formă cilindrică iar peretele său este constituit din 9 triplete de tuburi (dubletele din tija cilului ajung în corpusculul bazal unde li se adaugă încă un microtub pentru fiecare, realizând un model similar cu acela care caracterizează centriolii).

- Rădăcina ciliară este formată din tripletele corpusculului basal care trec în citoplasma apicală.

11.6.2. Specializări ale plasmalemei bazale

La anumite tipuri celulare, care joacă rol deosebit în transportul activ al substanțelor, plasmalema basală se invaginează mai mult sau mai puțin profund împărțind citoplasma în compartimente care poartă numele de labirint basal. În labirintul basal se găsesc numeroase mitocondrii (nefrocitele tubului contort distal al nefronului).

11.6.3. Specializări ale plasmalemei și adezivitatea celulară

Celulele de același tip sunt separate unele de altele prin spații intercelulare (prin care circulă lichidul intercelular care transportă elemente nutritive, produse de secreție și deșeuri (întrerupte în anumite zone de aderență sau de joncțiune.

Tipurile de joncțiuni celulare sunt numeroase; mai frecvent întâlnite sunt următoarele : (fig.16).

- 1. + desmozomii ;
- 2. + joncțiunile etanșe ;
- 3. + joncțiunile cu goluri ;
- 4. + joncțiunile intermediare.

Desmozomii reprezintă sistemele cele mai complexe de joncțiuni celulare. Cel mai frecvent ei se găsesc sub formă maculară, ovalară, cu diametrul mare de 4 000 - 5 000 Å și diametrul mic de 1 500 - 1 900 Å.

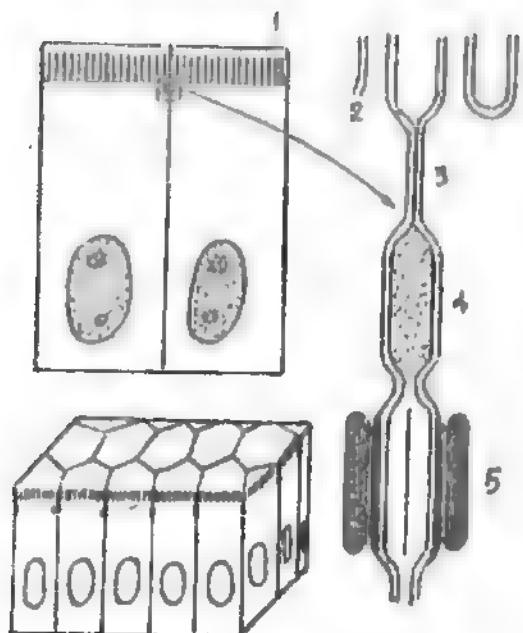


Fig. 16. Diferite tipuri de jonctiuni celulare

- 1/ Platou striat ; 2/ Cadru celular;
- 3/ Jonctiuni etanse ; 4/ Jonctiuni cu goluri ; 5/ Desmosom .

La microscopul electronic se constată că plasmalemele celulare alăturate nu fuzionează, ele stabilind contacte numai prin intermediul glicocalixului.

Aspectul morfologic al desmosomului este următorul :

+ între plasmalemele celulelor alăturate se găsește o bandă densă electrono-microscopic numită lamela centrală; ea reprezintă locul unde microfibriile glicocalixului celor două celule vecine se întrețin.

+ plasmalemele alăturate prezintă o îngrosare, în special la nivelul foțelor interne;

+ citoplasma la nivelul desmozomului este mai densă constituind placa citoplasmatică separată de plasmalemă printr-un spațiu clar;

+ microfibrile intracelulare pătrund în placa citoplasmatică unde formează o ansă, după care se întorc din nou în citoplasmă.

Desmozomii sunt structuri care se întâlnesc la nivelul epiteliorilor endotelior și mezotelior dar cu un grad diferit de diferențiere.

Interdigitatiile se observă în unele structuri tisulare în care plasmalemele alăturate au un contur sinuos și se angrenează una cu cealaltă după modelul roților dințate.

Interdigitatiile reprezintă o rezervă de suprafață celulară utilizabilă în cazul expansiunii cavitațiilor pe care le delimitizează. De exemplu la nivelul epitelialui vaginal, interdigitatiile sunt extrem de complexe ; spațiile cuprinse între celule reprezintă canalicule care, funcțional, joacă un rol foarte important în metabolismul lor.

Diferențierile temporare sunt considerate pseudodopodele granulocitelor precum și mișcările plasmalemei din endocitoză și exocitoză.

12. NUCLEUL IN INTERFAZA

12.1. Introducere

Nucleul, unitate structurală și funcțională, este centrul vital al celulelor eucariote, cu excepția eritrocitelor adulte. El conține informația genetică și are o influență hotăritoare asupra activității metabolice din citoplasmă.

La procariote ei posedă echivalenți ca de exemplu : granulațiile cromatice la protozoare, nucleoizii la bacterii, A.D.N.-ul viral.

Nucleul este locul unde se află memoria genetică necesară atât în procesul diferențierii celulare cît și pentru funcționarea normală a celulei.

Se poate afirma cu toată convingerea că expresia organizării fundamentale a materiei vii o reprezintă legătura strinsă dintre A.D.N.-ul nuclear și cito-plasma, condiție absolut necesară supraviețuirii.

Nucleului î se descriu două stări funcționale care trec dintr-una în alta la începutul și la sfîrșitul fiecărei mitoze.

(a/. forma metabolică în care se desfășoară procese de sinteză care pregătesc diviziunea celulară și

(b/. forma mitotică.

12.2. Forma nucleului

Forma nucleului este variată, urmărind în mod obișnuit forma celulei în care se găsește.

Ca și celulele, nucleul poate îmbrăca următoarele forme: (fig.17).

+ sferică în celulele sferice (ovocit, leucocite tinere), cubice (tireocit), poliedrice (hepatocit);

+ ovalară în celulele prismatice ale epitelialui intestinal;

+ bastonas sau fuziform în celulele musculare (miocite);

+ polilobat în leucocitele mature (granulocite) în care nucleul este alcătuit din 2 ~ 5 lobi, mai mult sau mai puțin separați între ei.

Forma nucleului depinde de tipul celulei, de vîrstă și de ciclul funcțional. De exemplu, celulele secretorii aflate în plin proces de sinteză au un nucleu cu contur neregulat; în fibra musculară aflată în contractie nucleul suferă o răsucire.

În mod obișnuit, în celulă nucleul ocupă o poziție centrală, poziție care poate fi modificată de numeroși factori dintre care amintim:

+ acumularea de granule secretorii (în celulele glandulare cu secreție exocrină nucleul este dispus basal);

+ acumularea de substanțe de rezervă (în adipocit nucleul este impins la periferia celulei și capătă formă de disc).

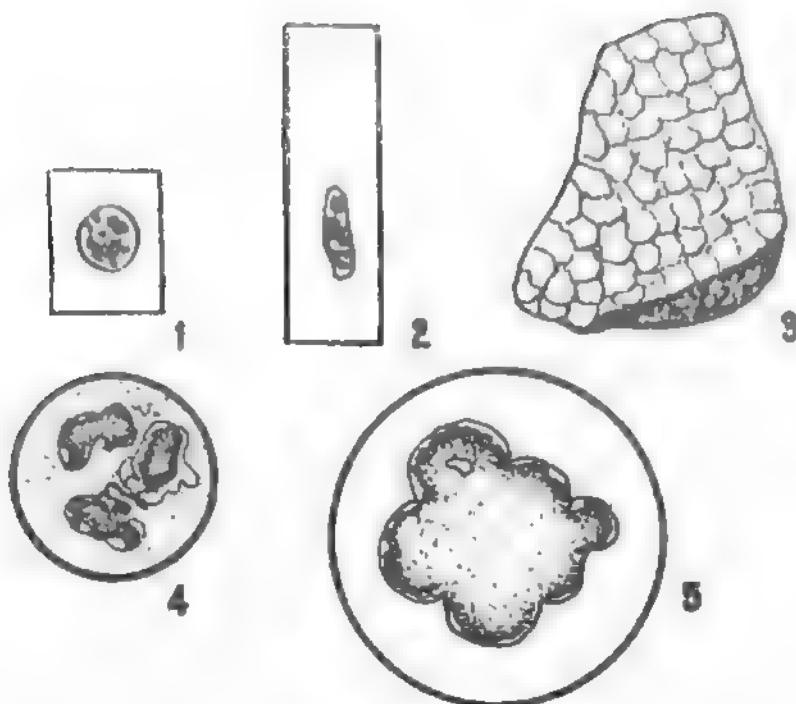


Fig. 17. Diferite forme de nuclei.

1/ rotund; 2/ ovalar; 3/ turtit;
4/ lobat.

12.3. Dimensiunile nucleului

Talia și volumul nuclear variază de la un tip celular la altul, depinzind de faza ciclului celular, în care se găsesc precum și de activitatea lui funcțională.

In general, dimensiunile nucleilor sunt cuprinse între 3 și 20 - 25 micromi. In celulele granulare din cerebel talia nucleului nu depășește 2-3 micromi, nucleul spermatozoidului are 4 micromi, iar ovulul are un nucleu care măsoară 20 - 25 micromi.

Talia și volumul nucleilor sănătății în funcție de dimensiunile celulelor; cu alte cuvinte trebuie să existe un raport nucleo-plasmatic (N.P.) care este constant pentru fiecare tip celular în parte. El poate fi calculat cu ajutorul indecelui nucleo-plasmatic.

$$N.P. = \frac{V_n}{V_c - V_n} = 1/3 \text{ pînă la } 1/20 - 1/30$$

V_n = volumul nuclear ; V_c = volumul celulei.

În cazul în care volumul celulei crește mai mult decît volumul nucleului, raportul nucleo-plasmatic va fi refăcut printr-o diviziune celulară sau printr-o creștere a volumului nuclear.

12.4. Numărul nucleilor

Marea majoritate a celulelor corpului uman au un singur nucleu (mononucleate). Fac excepție eritrocitele adulte care au pierdut nucleul în vederea adaptării la funcția de transportor al oxigenului (anucleate).

La unele tipuri celulare cu activitate mai intensă există doi nuclei (binucleate) ca de exemplu în hepatocite sau în unii neuroni din ganglionii simpatici.

Unele celule conțin în citoplasma lor mai mulți nuclei (celule multinucleate). De exemplu celula musculară striată conține nuclei de ordinul sutelor. După modul lor de formare, celulele multinucleate se clasifică în plasmodii și sincitii.

(+ plasmodiul) rezultă dintr-o celulă mononucleată în care au loc mai multe diviziuni nucleare neînsorite însă și de citodiereză (celula musculară striată, osteoclastul) .

(+ sincitul \ rezultă din contopirea mai multor celule într-o masă comună (sincitul trofoblastic de la suprafața vilozităților placentare).

Crescerea numărului de nuclei se datorează fie unei creșteri a activității metabolice (hepatocit) fie ca o necesitate de informație genetică nucleară pentru sinteza proteinelor (celula musculară striată, sincitul trofoblastic).

12.5. Structura nucleului

în interfază

Atât în microscopia optică cât și în cea electronică nucleul apare format din :

1. înveliș nuclear sau nucleolema;
2. cromatina ;
3. nucleoli;
4. sucul nuclear sau carioplasma.

12.5. 1. Învelișul nuclear

Invelișul nuclear este un complex membranar trilamelat caracteristic celulelor eucariote, care controlează schimburile dintre nucleu și citoplasmă.

În microscopia fotonică nucleolema apare sub forma unei linii fine care separă conținutul nucleului de citoplasmă în perioada interfazică.

În microscopia electronică nucleolema este alcătuită din :

a/ o membrană externă cu o grosime de 75 Å, trilamelată formată dintr-o foită centrală osmiofilă acoperită pe ambele fețe de către o foită osmiofilă;

membrana externă se continuă cu membranele reticulului endoplasmatic și pe fața care vine în contact cu citoplasma se găsesc atașați ribozomii.

b/ o membrană internă având o structură identică cu precedenta (fig. 18).

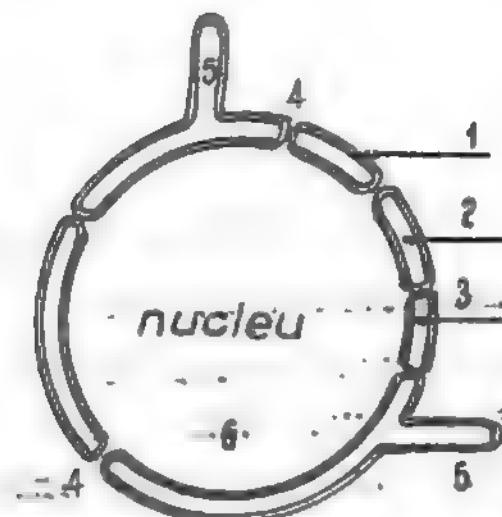


Fig.18. Învelișul nuclear

1/ membrană externă; 2/ cisterna perinucleară ;
 3/ membrana internă; 4/ pori ; 5/ reticul endoplasmatic
 6. nucleoplasma.

c/ un spatiu numit cisternă perinucleară delimitat de cele două membrane și care comunică cu cavitatele reticulului endoplasmatic.

d/ porii nucleari, nivel la care membranele externe se continuă cu cele interne.

Grosimea totală a învelișului nuclear este de aproximativ 350 \AA .

Porii nucleari sunt structuri complexe apărute datorită unor zone de intrerupere a învelișului nuclear

limitați la periferie de o formătire inelară. El intervin în reglarea schimburilor dintre nucleu și cito-plasmă.

Numărul lor este proporțional cu activitatea celulei; cu cât o celulă este mai activă, cu atât numărul porilor va fi mai mare demonstrând astfel că ei sunt structuri dinamice și nu statice.

Porii sunt alcătuși din următoarele structuri:

+ materialul inelar ;

+ diafragma ;

+ elemente centrale.

a/ Materialul inelar este format din 16 particule sferice de 200 \AA diametru, dispuse cîte 8 pe fiecare deschidere a porului. Particulele sunt alcătuite din microfibrile cu traiect foarte sinuos.

b/ Diafragma este formată dintr-o substanță densă, amorfă care se inseră pe conturul porului și se dirijează către centru.

c/ Granula centrală de 250 \AA ocupă centrul porului.

d/ Materialul fibrilar este reprezentat prin microfibrile care unesc granula centrală de granulele periferice. (Fig. 19).

Porii joacă un rol important în schimburile nucleoplasmaticice și în transferul de informații.

12.5.2. Cromatina

Examenul în microscopia optică a nucleilor fixați și tratați pe coloranți bazici indică existența

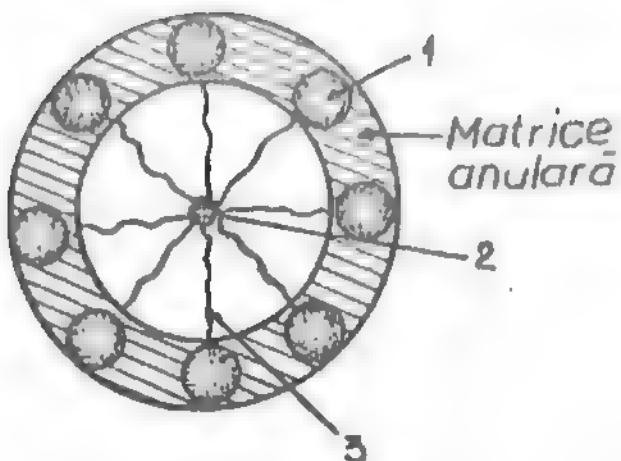


Fig. 19. Structura porului

1/ granule periferice; 2/ granula centrală ;
3/ elemente fibrilare.



Fig. 20. Diferite aspecte ale cromatinei
1/cromatină fin granulară; 2/ cromatină în bulgări;
3/ cromatină în rețea.

unei substanțe intens bazofilă numită cromatină.
(Fig. 19).

În același nucleu, cromatina poate îmbrăca două aspecte morfologice care reprezintă stări funcționale diferite:

+ heterocromatina sau cromatina condensată sub

formă de bulgări de diferite dimensiuni sau cromocentre; ea reprezintă cromatina metabolic inertă, inactivă genetic;

+ ecromatina apare constituită din granule fine, uniform disperse; este forma cromatinei biologic active.

Aspectul microscopic al cromatinei variază de la un tip celular la altul, cu vîrstă și starea ei funcțională.

In celulele somatice femele se individualizează o masă cromatică cu diametrul de aproximativ 1 micron care se atagează nucleolului sau fetii interne a membranei nucleare numită cromatina sexuală sau corpusculul Barr. Ea se poate pune în evidență pe frotiuri cu celule din mucoasa bucală sau din epitelul vaginal, în care colorează intens cu cresyl violet și dă o reacție Feulgen pozitivă.

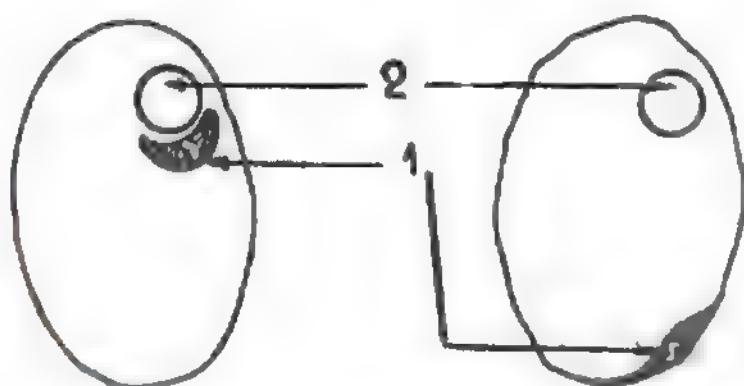


Fig. 21. Localizarea oromatinei sexuale.

1. corpuscul Barr; 2. nucleol

formă de bulgări de diferite dimensiuni sau cromocentre; ea reprezintă cromatina metabolic inertă, inactivă genetic;

+ eucromatina apare constituită din granule fine, uniform dispersate; este forma cromatinei biologic active.

Aspectul microscopic al cromatinei variază de la un tip celular la altul, cu vîrstă și starea ei funcțională.

In celulele somatice femele se individualizează o masă cromatică cu diametrul de aproximativ 1 micron care se atașează nucleolului sau fetii interne a membranei nucleare numită cromatina sexuală sau corpusculul Barr. Ea se poate pune în evidență pe frotiuri cu celule din mucoasa bucală sau din epitelul vaginal, în care colorează intens cu cresyl violet și dă o reacție Feulgen pozitivă.

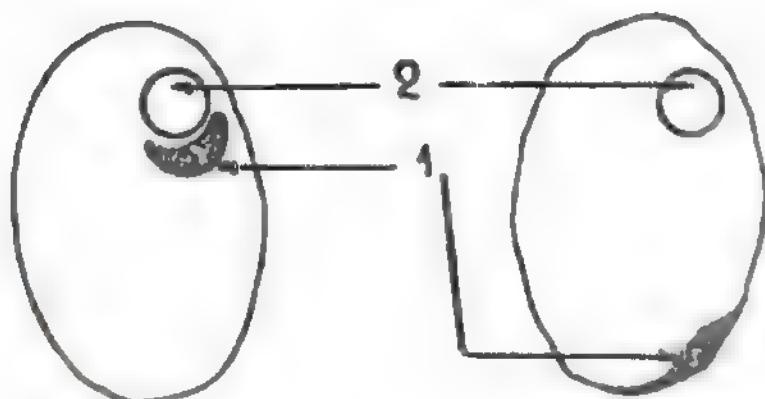


Fig. 21. Localizarea cromatinei sexuale.

1. corpuscul Barr; 2. nucleol

În microscopia electronică cromatina apare sub forma unor fibrile de 20 \AA grosime care se spiralizează formând complexe cromatiniene. Unitățile din care sunt formate aceste complexe se numesc fibre cromatiniene sau cromoneme.

Molecula de A.D.N. bicatenar se înfășoară pe niște particule de proteine-histone numite nucleosomi și formează un nucleofilament: acesta suferă o spiralizare care duce la formarea unei cromoneme cu diametrul de 250 \AA .

Cromatina conține aproximativ 98% din totalitatea de A.D.N. celular (2% A.D.N. se găsește în mitocondrii). Prezența lui în nucleu este demonstrată cu ajutorul reacției Feulgen sau verde de metil-pironină.

12.5.3. Nucleolul

Nucleolul este un organit responsabil de sinteza acizilor ribonucleici, ribozomali, prezent în nucleii interfazici, absent în timpul mitozei.

În microscopia optică el apare sub forma unei granule refringente, sferice sau ovale, înconjurată mai mult sau mai puțin de un inel de cromatină.

Fiecare nucleu conține 1-2 sau mai mulți nucleoli, care se colorează în roșu cu tehnica verde de metil-pironină.

Raportul dintre nucleu și nucleol (N/n) se modifică în favoarea nucleolilor ori de câte ori celula este hiperactivă (în timpul sintezei proteinelor de structură sau a proteinelor metabolice). (Fig. 22).

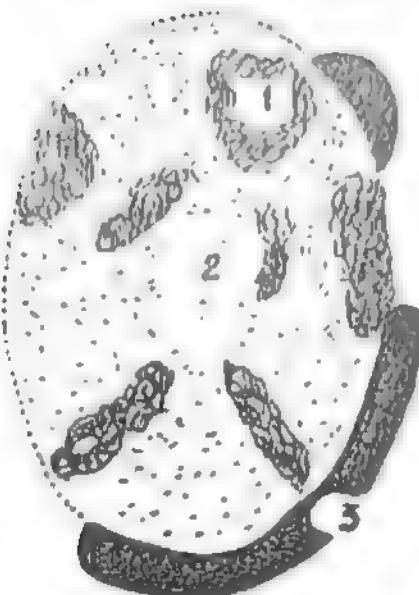


Fig. 22. Ultrastructura nucleolului

1. pars fibrosa ; 2. pars granulosa; 3. pars cromosoma

La microscopul electronic, nucleolul apare format din :

+ structuri fibrilare cu un diametru de 40-80 Å și cu o lungime de 200-400 Å, având o densitate electrică identică cu a fibrelor chromatiniene.

+ granulele cu un diametru de 150 Å și care se aseamănă cu ribozomii : au o zonă periferică densă și una centrală mai clară.

+ cromatina alcătuită din fibre chromatiniene dispuse la periferia nucleolului și care pătrund uneori în structura lui; bogat în A,D,N., acest material chromatian intră în alcătuirea unor segmente de cromozomi cu rol în organizarea materialului nucleolar;

+ pars amorfă este o zonă puțin densă la fluxul de electroni.



12.5.4. Carioplasma

Carioplasma sau sucul nuclear este formată dintr-o masă fluidă slab bazofilă și care scaldă cromatina și nucleolul.

13. ORGANITE SI INCLUZIUNI CELULARE

13.1. Introducere

Organitele celulare reprezintă diferențieri structurale ale citoplasmei care îndeplinesc funcții deosebit de importante.

Din punct de vedere structural, organitele se împart în :

1. organite cu structură membranară din care fac parte : reticulul endoplasmatic, mitocondriile, complexul Golgi, lisozomii și peroxizomii;

2. organite fără structură membranară în care se includ : ribozomii, centrozomul, microtubii și microfilamentele.

13.2. Ribozomii

Ribozomii sau corpusculii lui Palade (1953) sunt particule submicroscopice compacte, constituite din ribonucleoproteine.

La microscopul electronic ei apar sub forma unor granule ovalare sau elipsoidale cu diametrul mare de aproximativ 200 \AA și cel mic de $160 - 170 \text{ \AA}$.

Cu ajutorul tehniciilor de colorare negativă se pune în evidență un său transversal, perpendicular pe axul mare al particulei, care împarte ribozomul în două subunități inegale ca dimensiuni și structură.

Ribozomii se găsesc fie acolați de fața externă a membranelor reticulului endoplasmatic, fie liberi în hialoplasmă și au rol în sinteza de proteine prin asamblarea acizilor aminăți într-o ordine dinainte stabilită:

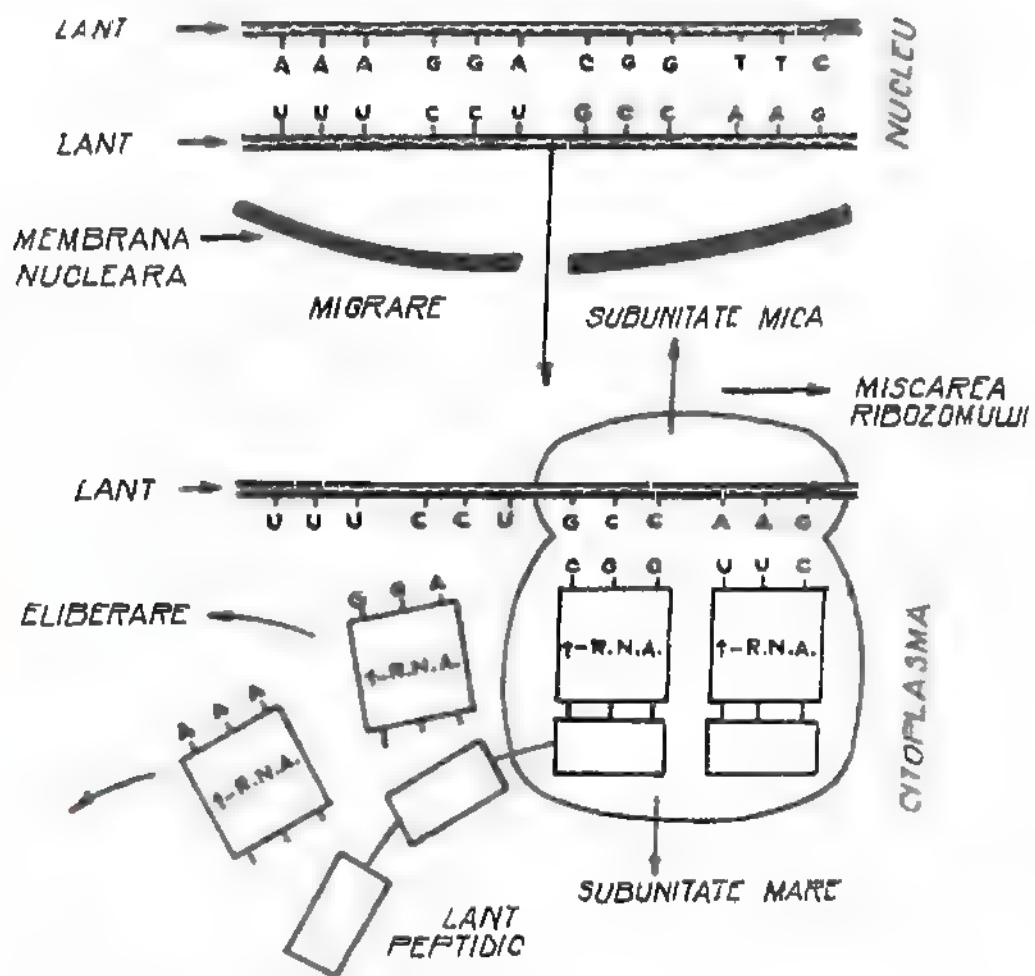


Fig. 23. Reprezentarea schematică a ribozomului

13.2.1. Polizomii sau poliribozomii sint formațiuni constituite dintr-o moleculă de acid ribonucleic mesager (A.R.N.m) pe care se fixează mai mulți ribozomi.

Poliribozomii reprezintă unitățile funcționale elementare la nivelul cărora se derulează sinteza de proteine în celulă.

Poliribozomii liberi din hialoplasmă sintetizează proteinele necesare activităților celulare pe cind polizomii legați de membrană sintetizează proteinele care vor fi excretate.

13.2.2. Biosintеза ribozomilor

Ribozomii iau naștere prin unirea acidului ribonucleic (A.R.N.r) cu o proteină).

A.D.N.-ul nucleolar care joacă rolul de model și pe care vin să se fixeze moleculele destinate sintezei de A.R.N.r. reprezintă un segment din A.D.N.-ul unui cromozom localizat în organizatorul nucleolar.

În timpul formării ribozomilor, formare care are loc numai în cazul în care numărul lor din hialoplasmă a scăzut sub normal, precursorul (A.R.N. 45 s) este încorporat la o proteină împreună cu care formează o ribonucleoproteină cu un coeficient de sedimentare de 80 s.

13.3. Mitocondriile

Mitocondriile sunt organe prezente în toate celulele, a căror rol major este de a înmagazina sub formă de adenozintrifosfat energia eliberată prin oxidare enzimatică a moleculelor nutritive.

13.3.1. Morfologia în microscopia optică

a/ Forma mitocondriilor poate fi :

- + bastoniformă
- + granulară

Forma lor poate fi diferită de la un tip celular la altul sau chiar de la o celulă la alta. În enterocite, mitocondriile au o dispoziție bipolară: la polul apical ele au formă de bastonă și în timp ce la polul bazal au un aspect granular.

b/ Talia mitocondriilor este și ea un element variabil. În hepatocite, nefrocite, ele măsoară aproximativ 3 microni lungime și 0,5 - 1 microni grosime, iar în fibrele musculare ajung la 8 microni lungime.

c/ Numărul mitocondriilor dintr-o celulă variază în funcție de necesitățile energetice de care are nevoie. În hepatocite, nefrocite, numărul lor este mare față de adipocite, limfocite, unde numărul lor este redus.

d/ Distributia lor în citoplasmă nu este fixă, ele îndreptindu-se spre regiunile în care celula are mai multă nevoie de energie: perinuclear, în vecinătatea plasmalemei lîngă reticulul endoplasmatic rugos.

În tubii renali ele sunt dispuse în regiunee bazală a nefrocitelor deoarece eliberarea de energie este utilizată de membrană în vederea transportului activ de substanță; în hepatocite sunt dispuse de-a lungul axului care unește polul vascular cu cel biliar; în celulele ciliate se găsesc în apropierea centrului kinetic al cilului sau corpusculul bazal.

13.3.2. Ultrastructura mitocondriilor

În microscopia electronică, mitocondriile au o

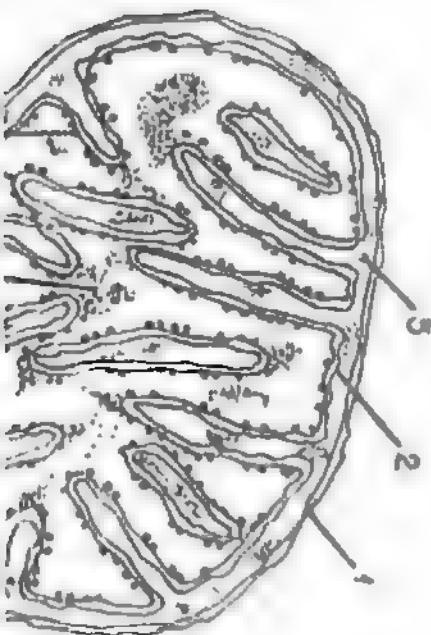
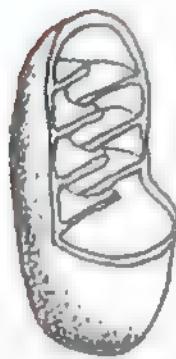
Fig. 24. Reprezentarea schematică în M.E. a mitocondriei. 1. membrana externă; 2. membrana internă; 3. camera externă; 4. camera internă cu matricea; 5. creste mitocondriale.

b/ c membrană internă de 5-70 \AA grosime, și lamelată, care trină expansiuni digitiforme în interiorul mitocondriei, formațiuni numite creste mitocondriale; c/ camera externă este spațiul cuprins între membrane interne și cea externă, larg de 40-70 \AA și care comunică cu lumenul creștelor mitocondriale; este puțin deosebă la fluxul de electroni;



formă sferică, alungită sau contorată. În structura lor intră (fig.24) :

a/ o membrană exterană de 50-70 μ grosime, trilamelată, netedă pe fața sa internă ; fața sa exterană emite din loc în loc proiecții rare și scurte ;



d/ camera internă este spațiul limitat de membrana internă și cuprins între creștele mitocondriale; este ocupat de granule fine a căror densitate electro-no-microscopică variază în funcție de starea funcțională a organitului.

Matricea mitocondrială care ocupă camera internă, conține în mod constant:

- + molecule de A.D.N. (2% din cantitatea totală)
- + mitoribozomi (acid ribonucleic mitochondrial - A.R.N.mt) vizibili după colorații negative;
- + granulații dense, neregulate, de aproximativ 500 Å diametru, reprezentând acumulări de cationi.

13.4. Reticulul endoplasmatic

Reticulul endoplasmatic este un organit care apare sub formă unor canalicule și cisterne, limitate de membrană de natură lipoproteică cu grosime de 50-60 Å. El îmbracă două forme care comunică una cu cealaltă dar care diferă prin structură și funcții:

a/ reticulul endoplasmatic granular (R.E.G.) care prezintă pe fața externă a membranelor sale ribozomi;

b/ reticulul endoplasmatic neted (R.E.N.)

Diferențierea morfologică și funcțională dintre cele două forme se face numai cu ajutorul microscopului electronic. (Fig.25).

Canaliculele reticulului endoplasmatic (cu un diametru cuprins între 50-500 Å), sunt dispuse sub forma unei rețele sau labirint canalicular.

La locul de întretăiere formează niște dilatații sau cisterne care pot ajunge la 2000 \AA diametru.

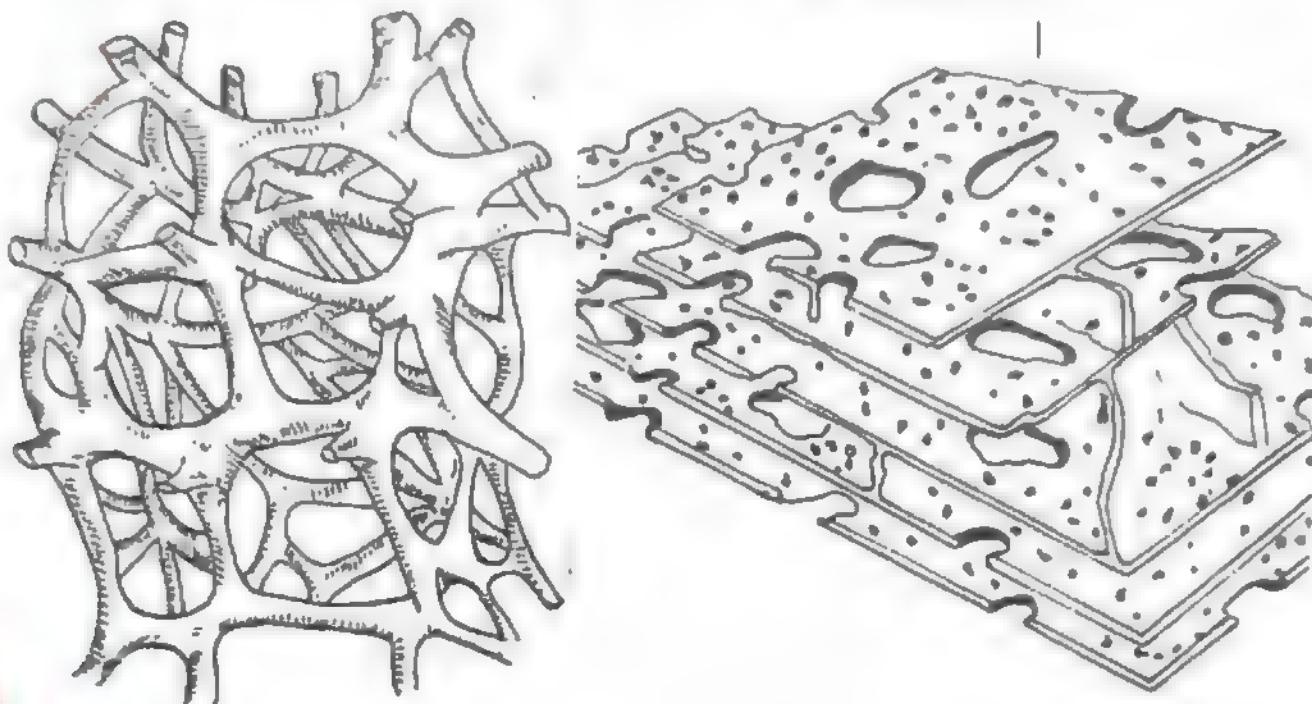


Fig.25. Reprezentarea schematică în M.E. a :
1.R.E.R.; 2. R.E.G.

Reticulul endoplasmatic face legătura între membrana plasmatică și foile externe a membranei nucleare constituind un sistem circulator intracitoplasmatic.

Poziția reticulului endoplasmatic diferă în raport de funcțiile tipului celular studiat. De exemplu, în celulele glandulare ale acinilor pancreatici, în parotidă sau glanda submaxilară, reticulul endoplasmatic ocupă segmentul basal al citoplasmei. În hepatocite, sacii ergastoplasmici au o dispoziție concentrică cunoscută sub numele de corpii lui Berg. În celulele nervoase (motoneuronii din coarnele anterioare ale măduvei spinării), sacii ergastoplasmici se reunesc în teritorii de dimensiuni mici care corespund corpusculilor lui Nissl din microscopia optică.

13.5. Complexul Golgi

Complexul Golgi este un organit format din unități elementare reprezentate prin cisterne turtite, fenestrare, care joacă un rol principal în transformarea și ambalarea proteinelor elaborate de reticulul endoplasmatic, în sinteza glicoproteinelor și a mucopolizaharidelor (M.P.Z.).

13.5.1. Morfologia în microscopia optică.

a/ Forma complexului Golgi este extrem de variată de la un tip celular la altul; chiar în aceeași celulă forma lui variază în raport de ciclul funcțional. Pe preparatele impregnate cu azotat de argint sau tetraoxid de osmu, el apare sub formă unei rețele dispuse în vecinătatea nucleului.

b/ Dimensiunile complexului Golgi diferă și ele în raport de tipul celular precum și de cilul ei funcțional (este foarte bine reprezentat în celulele glandei mame în lactație); este foarte dezvoltat în celulele glandulare și nervoase și redus în fibrele musculară netede.

c/ Pozitia este relativ fixă pentru fiecare tip celular. De exemplu în celulele cu secreție exocrină, complexul Golgi este situat între nucleu și polul apical pe cind în celulele endocrine el este situat între nucleu și polul bazal. El mai poate ocupa cind unul sau celălalt pol, indicind de fiecare dată polul secretor al celulei - "valsul complexului Golgi" - (celulele foliculare tiroidiene).

1.3.5.2. Morfologia în microscopia electronică

Complexul Golgi cuprinde două forme de organizare:

- + dihtiozomii;
- + cisterne sau vezicule

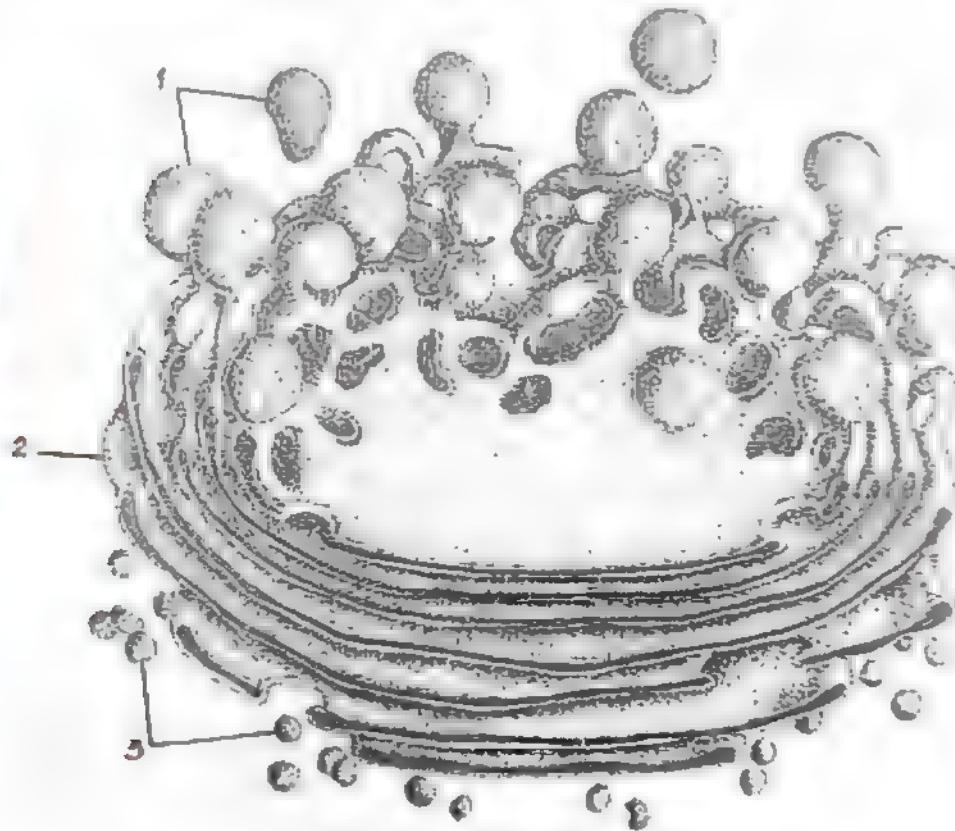


Fig.26. Reprezentarea schematică a complexului Golgi: 1.-vezicule de secreție părăsind față de formare; saci 2.-saci; 3.- vezicule de transfer.

a/ Dihtiozomul este format din pachete de saci aplatizați ; fiecare din ei are un lumen de 60-80 Å limitat de o membrană netedă cu o grosime de 50-65 Å .

Saciile golgiene sunt dispuși paralel, separați

între ei prin spații de 35-80 Å.

Fiecare dihtiozom are două fețe:

+ o față de formare (față imatură sau proximală) convexă, în raport cu învelișul nuclear sau cu membranele reticulului endoplasmatic;

+ o față de maturare sau distală, concavă, spre care se îndreaptă cisternele sau veziculele formate la extremitățile sacilor aplatizați; este îndreptată spre polul de excreție al celulei.

b/ Cisternele sau veziculele, mai mari sau mai mici (300-5000 Å) au un conținut puțin dens la fluxul de electroni în momentul desprinderii de extremitățile sacilor aplatizați ai dihtiozomului; odată cu migrarea lor către față de maturare a complexului Golgi, conținutul lor devine din ce în ce mai dens la fluxul de electroni (faza de maturare).

13.6. Lizozomi

Sunt organite celulare care se observă numai în microscopia electronică. Au o formă sferică iar conținutul lor este bogat în enzime hidrolitice.

a/ Membrana lizozomului are o structură trilamellată, dublată spre interior de o pătură glicoproteică rezistentă la acțiunea conținutului enzimatic; ea asigură lizozomului o latentă enzimatică.

b/ Matricea lizozomală apare la unii dintre ei granulară (lizozomi primari cu un diametru de 0,3-0,1 microni) iar la alții se pot observa în interior fragmente de membrană, de mitocondrii, fagozomi, etc. (lizozomi

secundari).

După natura materialului atacat de enzime, lizozomii secundari se clasifică în :

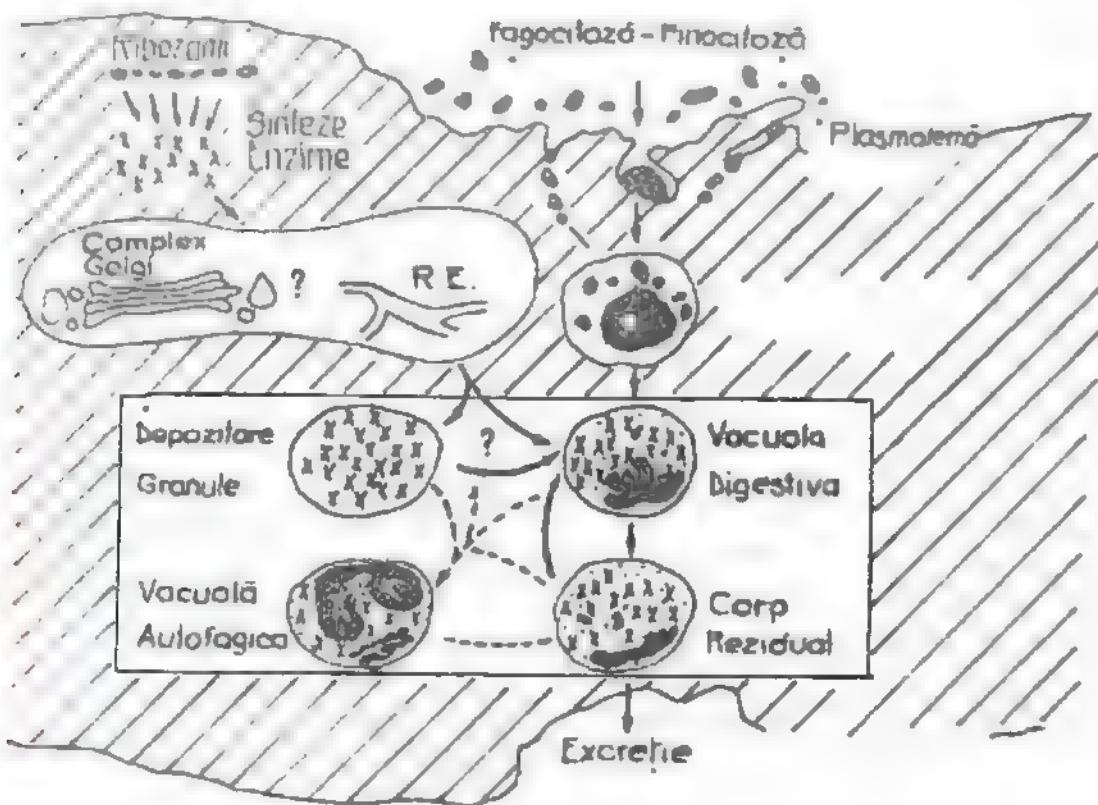


Fig.27. Reprezentarea schematică a formării lizozomilor și digestia celulară.

1. heterolizozomii care rezultă din fuzionarea lizozomilor primari cu fagozomii sau vacuolele de pinocitoză;

2. autolizozomii cînd enzimele lizozomale distrug structurile proprii ale celulei;

3. corpuri reziduiali sănt vacuole provenite dintr-un heterolizozom sau autolizozom în care persistă reziduri nedigerate de enzime lizozomale (figurile mielinice) ;

4. crinolizozomii rezultă prin fuziunea granulelor de secreție celulară destinate exportului, cu enzimele lizozomilor;

5. corpii multiveziculari sunt o varietate de lizozomi care conțin în matrice numeroase vezicule mici în care se desfășoară o intensă activitate fosfatazică.

13.7. Peroxizomi

Sunt organite celulare submicroscopice ce au un bogat conținut enzimatic, în special peroxidaze.

a/ Membrana care limitează la periferie conținutul peroxizomului, de 60-80 Å grosime, are o structură asemănătoare plasmalemei;

b/ Matricea este omogenă sau fin granulară, moderat densă la fluxul de electroni; conține uneori filamente ramificate.

Placa marginală este un element constant la toate speciile de mamifere; este liniară și se găsește la periferie peroxizomului.

13.8. Centrul celular (centrozomul)

Este un organit de dimensiuni mici, vizibil atât în microscopia electronică cît și în cea optică; este prezent în toate celulele care se divid, fiind observat mai bine în timpul desfășurării acesteia.

13.8.1. Morfologia în microscopia optică

Centrul celular prezintă aspecte diferite în raport de faza ciclului celular.

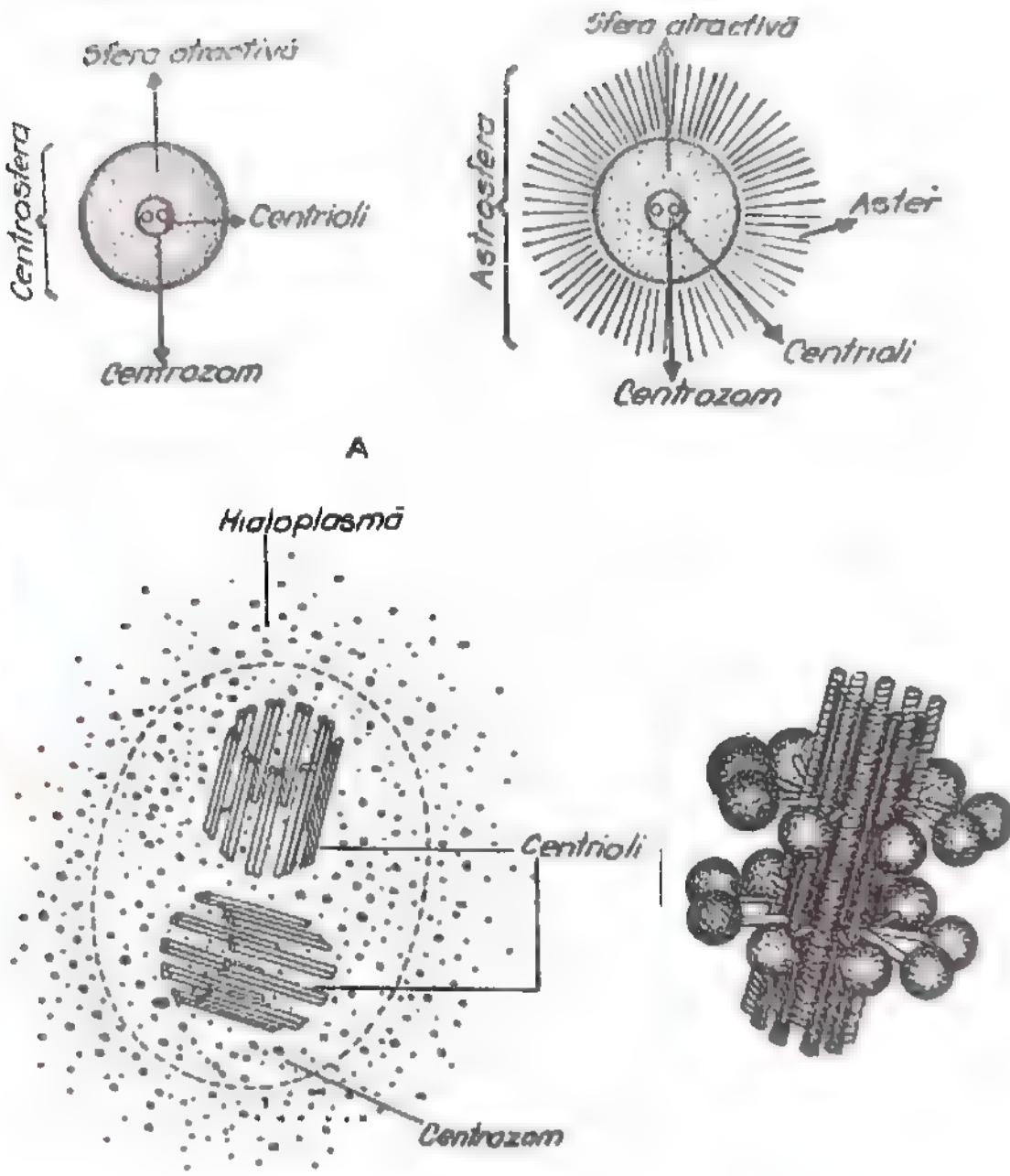


Fig.28. Centrul celular: a/ în microscopia optică; b/ în microscopia electronică



In interfază el are forma unei granule numită centrozom în interiorul căruia se află 1-2 corpusculi sau centrioli (în cazul în care există doi centrioli, formațiunea se numește diplozom).

Acstea formațiuni sunt înconjurate de o masă de citoplasmă mai densă numită centrosferă.

La periferia centrului celular se găsește asterul constituit din elemente fibrilare fine care se dispun radial în raport cu centrosfera.

Ansamblul centrosferă - aster se numește astro-sferă.

13.8.2. Ultrastructura centrului celular

Centrioul are forma lui cilindru de 0,15-0,25 microni lungime și 200-260 Å lărgime, a cărui perete este format din nouă grupe de cîte trei tubi sau triplete.

Fiecare tub este alcătuit din 13 microfilamente de 45 Å diametru, dispuse împrejurul unei cavități centrale clare.

Centrul extremității distale a centrioului (orientat către periferia celulei) este ocupat de un cilindru din material opac către care converg liniile dense la fluxul de electroni; ele pornesc de la fața internă a unui tub din fiecare triplet.

13.9. Microtubuli

Microtubuli sunt formațiuni cilindrice, alungite, cu un diametru de aproximativ 250 Å care intervin în menținerea formei celulelor, în transportul de substanțe, în mobilitatea celulei, etc.

Ei su un perete dens la fluxul de electroni, gros de 50 Å și o cavitate axială puțin densă electro-nomicroscopic largă de 140 ± 150 Å.

13.Io. Microfilamentele

Sunt organite celulare submicroscopice, jucînd un rol important în fenomenele de endo și exocitoză, precum și în timpul diviziunii celulare.

13.II. Incluziunile celulare

În citoplasma celulelor se pot găsi incluziuni care reprezintă produse de elaborare ale complexului Golgi, substanțe captate din mediul extracelular și reținute de celule sau produse de dezasimilație.

Spre deosebire de organitele celulare care su un caracter permanent, incluziunile celulare su un caracter temporar.

În celulă iau diferite forme și în microscopia optică se pot evidenția prin folosirea tehnicilor de citochimie.

Incluziunile pot fi formate din :

- + substanțe proteice;
- + grăsimi ;
- + glicogen;
- + substanțe minerale (fier-siliciu) și vitamine;
- + granule de secreție - zimogen
 - mucus
 - pigmenti (melanină).

14. DIVIZIUNEA CELULARĂ

14.1. Introducere

În biologia celulară diviziunea este unul din fenomenele cele mai complexe.

Toate celulele cu excepția celor nervoase sunt capabile de a se divide, adică de a forma două celule fiice, cu aceleasi caractere morfologice și funcționale ca și celula mamă.

Prin diviziunea celulară se realizează atât un proces de creștere și diferențiere a organismelor cât și reproducerea lor.

La om multiplicarea celulară se face prin:

- + diviziunea indirectă, cariokineză sau mitoză
- + diviziunea directă sau amitoza.

14.2. Mitoza

Diviziunea indirectă sau mitoza interesează:

- + toate elementele nucleare;
- + toate elementele citoplasmatice

Ea se caracterizează prin :

+) spiralizarea cromozomilor care se separă în vederea repartizării lor în număr egal între cele două celule fiice ;

+ apariția în citoplasmă a unui mănușchi de microtubi care îndrumă mișcarea cromozomilor.

(Mitoza prezintă două forme):

- 1) a/ mitoza somatică sau mitoza propriu-zisă

care interesează celulele somatice (homeotipică, ecuațională);

b/ mitoza reducțională sau meioza, care interesează numai celulele sexuale (heterotipică).

I 14.2.1. Mitoza somatică

Desfășurarea mitozei se face în patru stadii: profaza, metafaza, anafaza și telofaza.

14.2.1.1. Profaza (P)

a/ Fenomenele nucleare se caracterizează prin apariția cromozomilor. La început subțiri, cromozomii se îngroașă prin spiralizarea cromonemelor. Centromerul sau kinetocorul a cărui poziție este constantă pentru fiecare cromozom, devine vizibil.

Cromozomii se apropie de învelișul nuclear lăsând un spațiu centro-nuclear gol.

b/ Fenomenele citoplasmatice se caracterizează prin îndepărțarea celor doi centrioli ai diplozomului. Între ei apar microtubi care formează fusul de diviziune.

Mitocondriile se fragmentează.

Înaintea începerii celei de a doua faze, nucleolul și membrana nucleară dispar iar cromozomii migrează către regiunea ecuatorială a celulei; ei stabilesc contact cu microtubii fusului de diviziune care se inseră la nivelul centromerului.

14.2.1.2. Metafaza

Cromozomii se scurtează prin accentuarea spiralișării și se găsesc pe un plan care trece prin mijlocul celulei formând placa ecuatorială, perpendiculară pe direcția fusului de diviziune.

Cromozomii și orientează cromatidele către periferia celulară, placa ecuatorială fiind formată din centromerele centrozomilor pe care se fixează microtubii fusului de diviziune.

Suprafața celulară prezintă mișcări de fierbere.

Centromerul fiecărui cromozom precum și fiecare cromatidă încep să se cliveze longitudinal.

14.2.1.3. Anafaza

Se caracterizează prin separarea completă a celor două centromere și cromatide fiice și migrarea fiecărui cromozom nou format către ambii poli ai celulei.

În a doua jumătate a anafazei, în zona de cito-
plasmă care separă cele două grupe de cromozomi se gă-
sesc microtubii fusului de diviziune care iau denumirea
de microtubi interzonali.

Cele două grupe de cromozomi se găsesc la cei doi poli ai celulei.

14.2.1.4. Telofaza

Cromozomii se despiralizează și devin foarte subțiri (cromoneme).

Se constituie membrana nucleară și la sfîrșitul

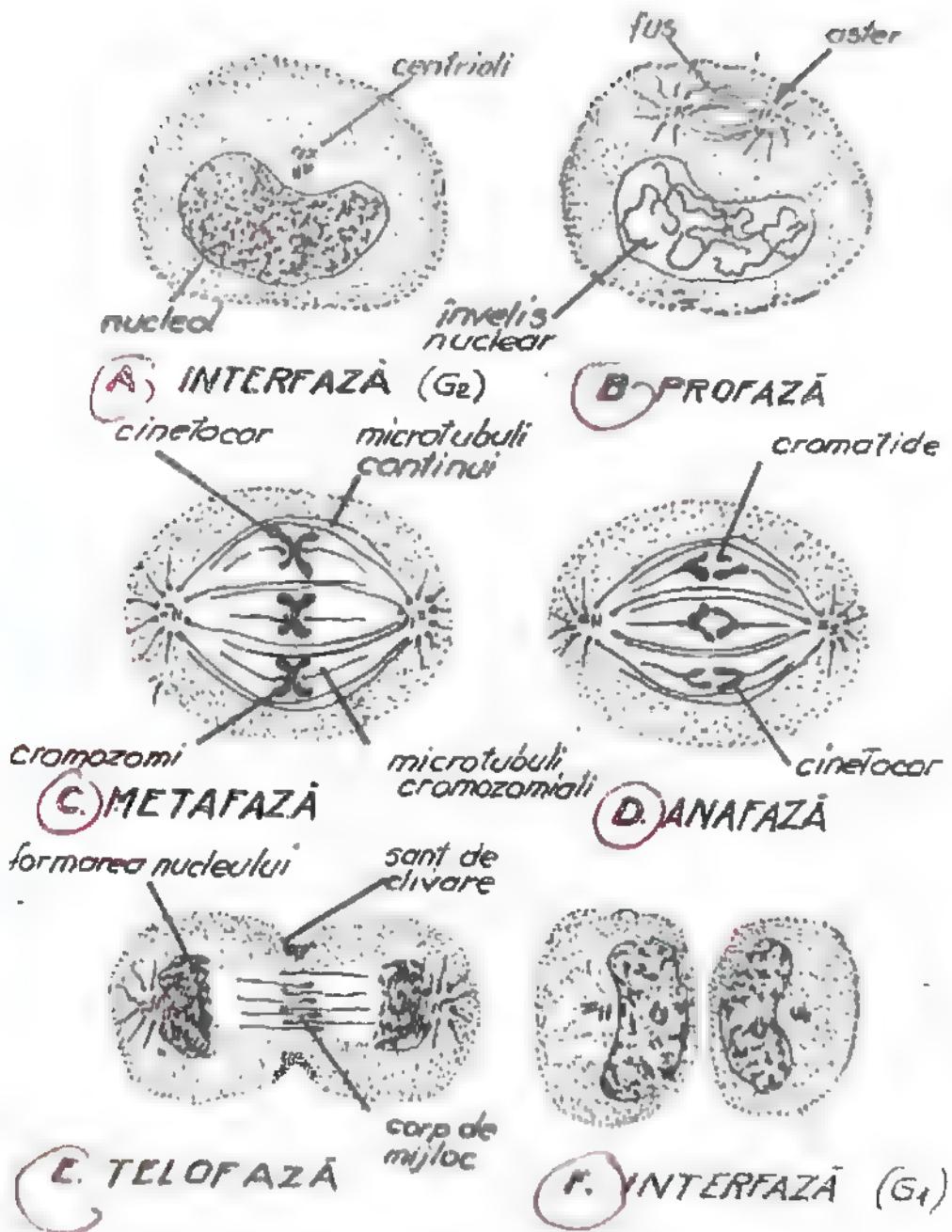


Fig.23. Reprezentarea schematică a etapelor mitozei somatice

telofazei apar nucleoli (din organizatorii nucleari).

În tot acest timp, partea mijlocie a celulei magă se strângulează; microtubuli interzonați ai fusului de diviziune din această zonă, formează un fel de membrană care separă viitoarele celule fiice.

Toate organelile celulare se repartizează aproximativ în mod egal între cele două celule fiice.

Mișcările periferice diminuă progresiv pînă la dispariție iar cele două celule fiice se separă complet.

14.3. Meioza mitza reducțională

Celulele sexuale mature sau gametii se formează în urma unui tip special de diviziune care poartă numele de meioză. Meioza cuprinde două diviziuni succesive:

1. meioza propriu-zisă sau diviziunea reducțională în urma căreia numărul diploid de cromozomi (46 sau 2N) este redus la jumătate (formulă cromozomială haploidă, 23 sau N).

2. diviziunea de maturare, ecuațională, care conservă numărul haploid de cromozomi.

14.3.1. Diviziunea reductională

Se dezvoltă patru faze: profaza, metafaza, anafaza și telofaza. Caracteristică este profaza care se desfășoară în cinci studii:

1. leptoteni;
2. zigoteni;
3. pahiteni;
4. diploteni;
5. diakineteni.

1. Stadiul leptoten începe o dată cu creșterea în volum a nucleului, replicarea A.D.N.-ului cromozomial și diferențierea cromozomilor care se găsesc în număr diploid.

2. Stadiul zigoten se caracterizează prin acolarea longitudinală a cromozomilor omologi (fiecare autozom de origine maternă se acolează la autozomul omolog de origine paternă). O astfel de perache ia numele de cromozomi bivalenti sau diadă.

La sfîrșitul acestei faze se găsesc 22 cromozomi bivalenti, deci s-a efectuat reducerea la jumătate a garniturii cromozomiale.

Cromozomii sexuali (xy sau xx) alcătuiesc o formatiune cunoscută sub numele de veziculă sexuală.

3. Stadiul pahiten. La nivelul fiecărei cromatide din diadă apare un clivaj longitudinal care determină apariția a două cromatide paralele. În urma acestui clivaj, fiecare bivalent va avea patru cromatide alcătuind o tetradă.

In această fază are loc un schimb de material genetic între cromatidele de origine paternă și cele de origine maternă, schimburile realizate prin legături chiazmatice, (crossing over).

4. Stadiul diploten se caracterizează prin separarea cromozomilor omologi din fiecare bivalent, ei rămînind legați numai la nivelul chiazmelor.

5. Stadiul de diakineză. Cromozomii bivalenti migrează spre periferia nucleului, legăturile lor

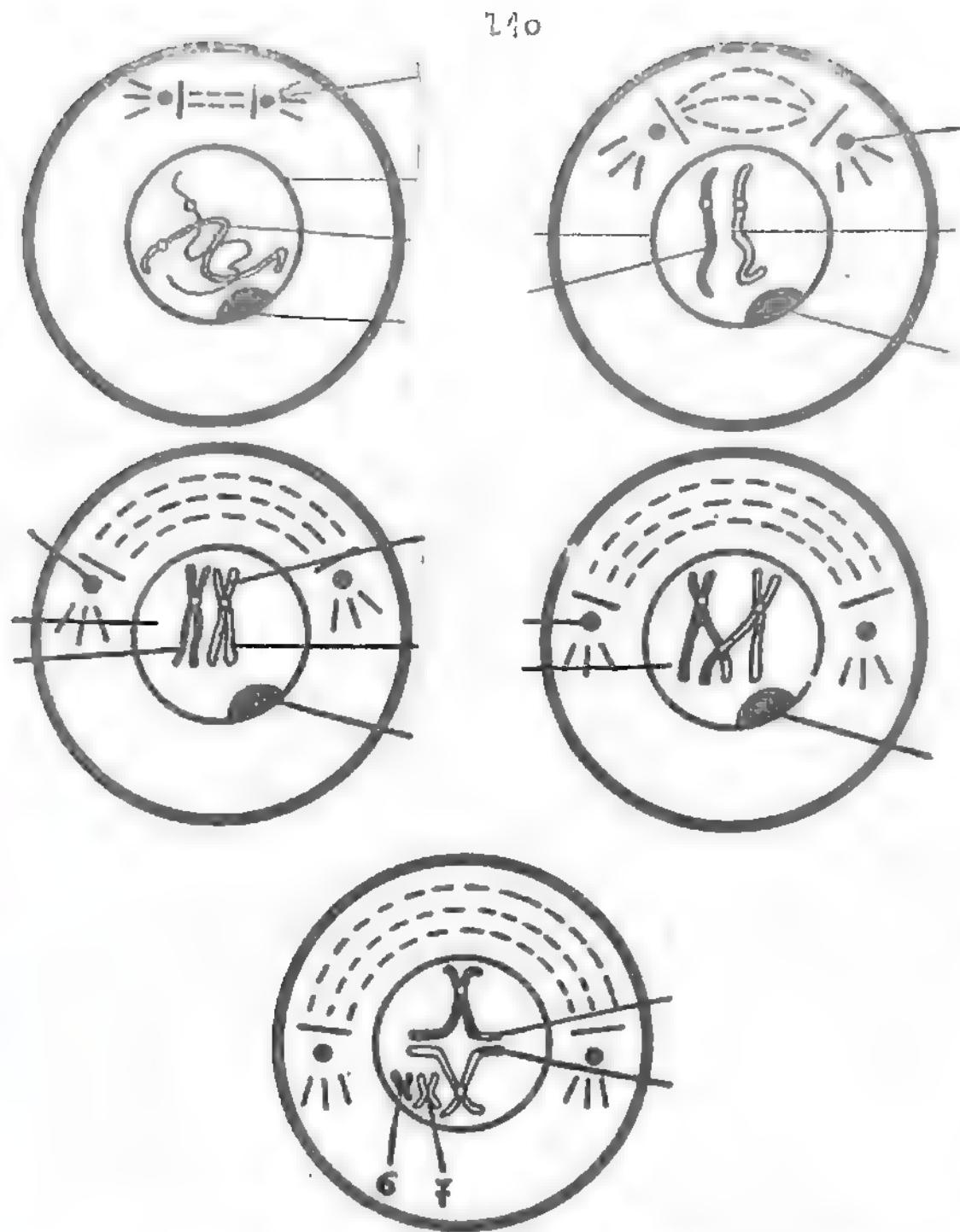


Fig.3a. Reprezentarea schematică a profazei meiozei. 1.-centrioli; 2.-nucleu; 3.-autozom matern; 4.-autozom patern; 5.-vezicula sexuală; 6.-gonosom Y; 7.-gonosom X; 8.-material genetic matern; 9.-material genetic patern.

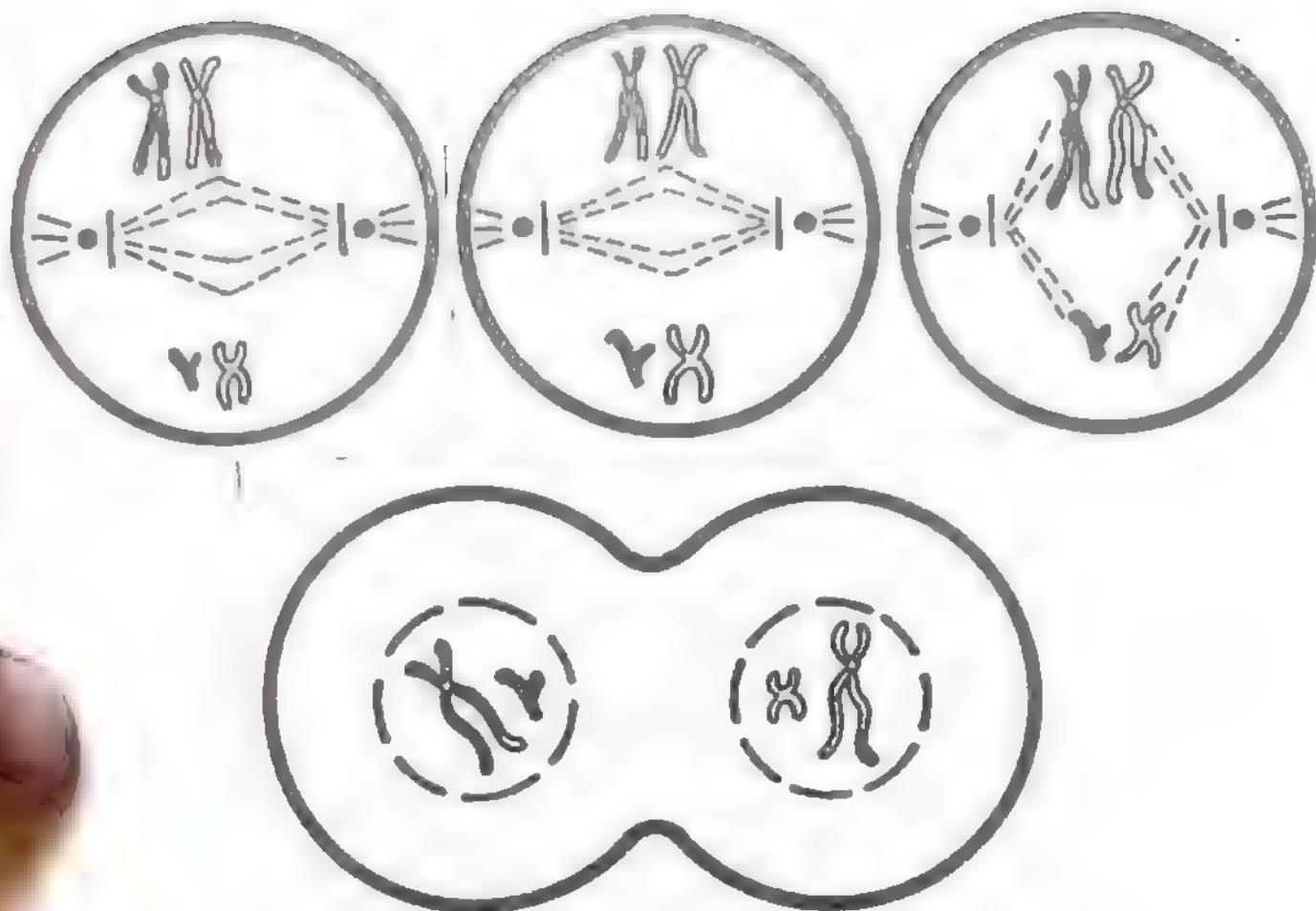


Fig. 31. Următoarele faze ale meiozei

A.-premetafaza; B.-metafaza; C.- anafaza;d.-telofaza

chiazmatice reducindu-se, foarte mult. Se individualizează cromozomii sexuali (xy sau xx). Dispare nucleolul iar membrana nucleară se dezintegrează. (Fig.24).

14.3.1.2. **Metafaza**

Cromozomii ocupă planul ecuatorial al celulei iar pe fiecare centromer se inseră microtubii fusului de diviziune.

14.3.1.3. **Anafaza**

Cromozomii din fiecare bivalent se separă, feno-

menul denumit disjuncție și migrație spre polii celulei.

14.3.1.4. Telofaza

Marchează începutul formării celor două celule fiice a spermatoцитelor și ovocitelor II, cu echipamentul cromozomial redus la jumătate (formulă haploidă, $N = 23$ cromozomi).

14.3.2. Diviziunea de maturare

Este o mitoză obisnuită, ecuațională, în care nu mai are loc replicarea A.D.N.-ului. În urma acestei diviziuni de maturare rezultă gametii apti pentru fecundare care conțin același număr haploid de cromozomi și celulele din care au iat naștere.

14.4. A mitoza sau diviziunea directă

Prin diviziunea directă se formează două celule fiice prin simpla strangulare a nucleului și a citoplasmei celulei mame, fără apariția cromozomilor.

Se întâlnește în hepatocite, celule cartilaginoase și osoase, etc.

În unele cazuri (hepatocite) diviziunea nucleului nu este însoțită și de împărțirea citoplasmei, ducind la apariția celulelor binucale.

Tot în acest mod iau naștere și plasmociliile.

T A B L A D E M A T E R I I

1. - METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC IN MICROSCOPIA FOTONICA	
1.1. - Introducere	1
1.2. - Recoltarea pieselor	5
1.3. - Fixarea și fixatorii citologici . .	6
1.4. - Oprirea fixării	11
1.5. - Includerea în parafină	11
1.6. - Secționarea blocurilor	14
1.7. - Lipirea secțiunilor pe lamă	14
2. - COLORAREA SI COLORANTI IN CITOLOGIE	
2.1. - Introducere	17
2.2. - Coloranți	17
2.3. - Clasificarea coloranților	18
2.4. - Mecanismele colorării	19
2.5. - Principalele metode de colorare . . .	20
2.6. - Colorarea cu hematoxilin - eozină. .	21
3. - METODE PENTRU EXAMENUL IN MICROSCOPIA FOTONICA	
3.1. - Frotiul	23
3.2. - Frotiul de sînge	23
3.3. - Frotiurile din material biologic provenit din organe ușor accesibile ...	28
3.4. - Frotiurile cu material biologic provenit din organe mai puțin accesibile	29

3.5. - Amprentele de organe	29
4. - METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC IN MICROSCOPIA FOTONICA	
4.1. - Indicatiile sectionarii la gheata si criotom	31
4.2. - Tehnica sectionarii la microtomul de congelare	32
4.3. - Colorarea pentru examenul extemporaneu..	33
4.4. - Lipirea sectiunilor	34
4.5. - Tehnica sectionarii la criotom	34
4.6. - Criodesicarea	35
4.7. - Metoda de congelare - substitutie . .	36
5. - METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC IN MICROSCOPIA ELECTRONICA	
5.1. - Introducere	38
5.2. - Prelevarea	39
5.3. - Fixarea	40
5.4. - Deshidratarea	41
5.5. - Includerea	42
6. - METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC IN MICROSCOPIA ELECTRONICA	
6.1. - Sectionarea	45
6.2. - Fasonarea blocului	46
6.3. - Aplicarea sectiunilor pe port-obiect..	49
6.4. - Contrastare	52
7. - METODE CURENTE DE CITOCHIMIE	
7.1. - Introducere	54
7.2. - Recoltarea pieselor	54
7.3. - Fixarea	54

7.4. - Includerea	56
7.5. - Secționarea	57
7.6. - Lipirea secțiunilor	57
7.7. - Reacțiile pentru evidențierea substanțelor	57
7.7.1.-Evidențierea histochemicală a unor substanțe minerale	58
7.7.2.-Evidențierea histochemicală a glucidelor..	59
7.7.3.-Evidențierea histochemicală a lipidelor...	60
7.7.4.-Evidențierea histochemicală a proteinelor..	61

8. - METODE CURENTE DE CITOENZIMOLOGIE

8.1. - Introducere	63
8.2. - Metode citoenzimologice	64
8.3. - Metode biochimice	68

9. - CULTURI DE CELULE

9.1. - Introducere	72
9.2. - Condiții materiale de lucru	73
9.3. - Mediile de cultură	74
9.4. - Clasificarea culturilor	76
9.5. - Tehnica culturii celulare	77

10.- FRACTIONAREA CELULARA

10.1.- Introducere	82
10.2.- Omogenizarea țesuturilor	85
10.3.- Studiul fractiunilor celulare	89

11. - CELULA

11.1. - Introducere	92
11.2. - Forma celulelor	94
11.3. - Dimensiunile celulelor	95
11.4. - Numărul celulelor	97
11.5. - Invelișul celulelor	97
11.5.1.- Plasmalema	97
11.5.2.- Glicocalixul	98
11.6. - Specializările plasmalemei	100

12. - NUCLEUL IN INTERFAZA

12.1. - Introducere	107
12.2. - Forma nucleului	108
12.3. - Dimensiunile nucleului	109
12.4. - Numărul nucleilor	110
12.5. - Structura nucleului în interfază...	111
12.5.1.- Invelișul nuclear	111
12.5.2.- Cromatina	113
12.5.3.- Nucleolul	116

13. - ORGANITE SI INCLUZIUNI CELULARE

13.1. - Introducere	119
13.2. - Ribozomii	119
13.3. - Mitocondriile	121
13.4. - Reticulul endoplasmatic	124
13.5. - Complexul Golgi	126
13.6. - Lizozomii	128
13.7. - Peroxizomii	130

13.8. - Centrul celular	• • • • • • • • • •	130
13.9. - Microtubuli	• • • • • • • • • •	132
13.10. - Microfilamentele	• • • • • • • • • •	133
13.11. - Inclusiunile celulare	• • • • • • • • • •	133

14. - DIVIZIUNEA CELULARA

14.1. - Introducere	• • • • • • • • • •	134
14.2. - Mitoză	• • • • • • • • • •	134
14.2.1. - Mitoză somatică	• • • • • • • • • •	135
14.2.2. - Mitoză	• • • • • • • • • •	138
14.3. - Amitoză	• • • • • • • • • •	142

15. - TABLA DE MATERII • • • • • • • • • •